

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „GRIGORE T. POPA” IAȘI

CERCETĂRI PRIVIND SINTEZA UNOR NOI DERIVAȚI DE TIAZOLIDIN-4-ONĂ CU POTENȚIALĂ UTILIZARE ÎN TRATAMENTUL DIABETULUI ZAHARAT

Rezumatul tezei de doctorat

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC
Prof. Univ. Dr. Lenuța PROFIRE

DOCTORAND
Sandra-Mădălina CONSTANTIN









Investeşte în oameni !
Proiect cofinanţat din Fondul Social European prin Programul Operaţional Sectorial pentru Dezvoltarea Resurselor Umane 2007 – 2013
Axa prioritară 1 „Educaţie şi formare profesională în sprijinul creşterii economice şi dezvoltării societăţii bazate pe cunoaştere”
Domeniul major de intervenţie 1.5 *„Programe doctorale şi post-doctorale în sprijinul cercetării”*
Titlul proiectului: *Parteneriat strategic pentru creşterea calităţii cercetării ştiinţifice din universităţile medicale prin acordarea de burse doctorale şi postdoctorale – DocMed.Net_2.0*
Contract nr.: POSDRU/159/1.5/S/136893
Beneficiar: Universitatea de Medicină şi Farmacie ”Iuliu Hatieganu” Cluj-Napoca
Partener P4 Universitatea de Medicină şi Farmacie “Grigore T. Popa” Iaşi

2016

Teza de doctorat conține 263 de pagini (65 de pagini anexe), 53 de tabele, 158 de figuri în teză, 227 de figuri în anexe și 245 referințe bibliografice.

Numerotarea figurilor, tabelelor și cuprinsul din cadrul rezumatului se păstrează în aceeași formă ca în teză.

Cuvinte cheie: *tiazolidin-4-onă, xantine, diabet zaharat, efect antioxidant, acțiune antimicrobiană, chitosan, microparticule, ADMET*

Statutul meu de bursier în perioada aprilie 2014-septembrie 2015 în cadrul proiectului ”Parteneriat strategic pentru creşterea calităţii cercetării ştiinţifice din universităţile medicale prin acordarea de burse doctorale şi postdoctorale – DocMed.Net_2.0”, POSDRU/159/1.5/S/136893, a contribuit la realizarea studiilor întreprinse în cadrul tezei de doctorat și la obținerea rezultatelor.

Inițierea mea în tainele cercetării științifice, formarea deprinderilor necesare acestei activități, precum și experiența cercetării din domeniul farmaceutic au fost realizate în cadrul disciplinei de *Chimie Farmaceutică* de la Facultatea de Farmacie din cadrul U.M.F. ”Grigore T. Popa” Iași. Dezvoltarea cunoașterii în domeniul chimiei organice, respectiv a celei heterociclice, necesară sintezei derivaților de tiazolidin-4-onă, s-a realizat în cadrul stagiului de 5 luni desfășurat la *Institutul de Chimie Organică și Analitică (ICOA)* din cadrul Universității din Orléans și Centrului Național de Cercetare Științifică (CNRS) Franța.

CUPRINS

ABREVIERI

^{13}C-RMN	*Spectroscopie de rezonanță magnetică de carbon*
^{19}F-RMN	*Spectroscopie de rezonanță magnetică de fluor*
^{1}H-RMN	*Spectroscopie de rezonanță magnetică de proton*
2D-COSY	*Correlation Spectroscopy (eng.)*
ABTS	*Acid 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic)*
ADMET	*Absorbție, Distribuție, Metabolism, Excreție și Toxicitate*
AGEs	*Produși de glicozilare avansată*
ALT	*Alaninaminotransferaza*
ANNE	*Ansambluri de rețele neurale artificiale*
AST	*Aspartataminotranferaza*
BHT	*Dibutilhidroxitoluen*
BPOC	*Boală pulmonară obstructivă cronică*
$CDCl_3$	*Cloroform deuterat*
CE_{50}	*Concentrație eficientă 50*
CHEM	*Concentrație eritrocitară medie de hemoglobină*
CLSI	*Clinical and Laboratory Standards Institute (eng.)*
CMB	*Concentrație minimă bactericidă*
CMF	*Concentrație minimă fungicidă*
CMI	*Concentrație minimă inhibitorie*
CRP	*Proteina C reactivă*
DEPT	*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (eng.)*
DL %	*Drug loading (eng.)*
DL_{50}	*Doză letală 50*
DMFA	*Dimetilformamidă*
DMSO	*Dimetilsulfoxid*
DMSO-d_6	*Dimetilsulfoxiddeuterat*
DPP IV	*Enzima dipeptidil-peptidaza IV*
DPPH	*1,1-difenil-2-picrilhidrazil*
DR %	*Drug Release (eng.)*
DZ	*Diabet zaharat*
EDCI	*1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodimidă*
EE %	*Entrapment efficiency (eng.)*
FDA	*Food and Drug Administration (eng.)*
FT-IR	*Spectroscopie IR cu transformanță Fourier*
GIP	*Polipeptidul linsulinotrop dependent de glucoză*
GLP-1	*Glucagon-like peptidaza-1*
Hb	*Hemoglobină*
HbA1c	*Hemoglobină glicată*
HBDH	*Numărul de grupări donoare de protoni*
HDL	*High Density Lipoprotein (eng.)*
HEM	*Hemoglobina Eritrocitară medie*
HMBC	*Heteronuclear Multiple Bond Correlation (eng.)*
HPLC	*Cromatografie de Lichide de Înaltă Performanță*
HRMS	*High Resolution Mass Spectrometry (eng.)*
HRP	*Peroxidaza din hrean*
HSQC	*Heteronuclear Single Quantum Coherence (eng.)*
I %	*Procent de inhibiție*
IC_{50}	*Concentrație inhibitorie 50*
ICC	*Insuficiență cardiacă congestivă*
ICR	*Insuficiență cronică renală*

IDF	*International DiabetesFederation*
IFCC	*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (eng.)*
IFNγ	*Interferon γ*
IL-1	*Interleukina-1*
IL-6	*Interleukina-6*
IR	*Infraroşu*
LDH	*Lactat dehidrogenază*
LDL	*Low Density Lipoprotein (eng.)*
Log D	*Coeficient de distribuție octanol/apă*
Log P	*Coeficient de partiție octanol/apă*
M_NO	*Numărul de atomi de azot și oxigen*
MCH	*Microparticule de chitosan*
MIDD	*Diabetul mitocondrial*
MPV (fL)	*Volumul Trombocitar Mediu*
MW	*Microunde*
NAD	*Nicotinamide adenine dinucleotide (eng.) – forma oxidată*
NADH	*Nicotinamide adenine dinucleotide (eng.) – forma redusă*
Neut W-LCC($x10^3$µL)	*Număr absolut de neutrofile*
Neut W-LCR %	*Număr procentual de neutrofile*
OMS	*Organizația Mondială a Sănătății*
PCT %	*Procalcitonina*
PDW (fL)	*Lărgimea distribuției trombocitare*
PGE_2	*Prostaglandine* E_2
P-LCR %	*Macrotrombocite*
PPAR	*Receptor activat al proliferării peroxizomale*
PTZ	*Pentetrazol*
R^2	*Coeficient de corelație*
RDW	*Lărgimea distribuției eritrocitare*
RDW-CV %	*Lărgimea curbei de distribuție a eritrocitelor în funcție de volum – coeficient de variație*
RDW-SD (fL)	*Lărgimea curbei de distribuție a eritrocitelor în funcție de volum – deviație standard*
Rf	*Factor de retenție*
ROS	*Specii Reactive de Oxigen*
SD %	*Swelling degree (eng.)*
SDBS	*Spectral Database for Organic Compounds (eng.)*
SEM	*Microscopia electronică de baleiaj*
SNC	*Sistem nervos central*
SOD	*Superoxid Dismutaza*
T_PSA	*Aria topologică a suprafeței polare*
THF	*Tetrahidrofuran*
TNF-α	*Factorul de necroză tumorală α*
TPP	*Tripolifosfat pentasodic*
UFC	*Unități Formatoare de Colonii*
VEM	*Volumul Eritrocitar Mediu*
VLDL	*Very Low Density Lipoprotein (eng.)*

MULȚUMIRI

Doresc să aduc cele mai sincere sentimente de recunoștință și mulțumire conducătorului de doctorat, doamna ***Decan Prof. dr. Lenuța Profire***, pentru tot sprijinul necondiționat acordat pe parcursul studiilor din cadrul tezei de doctorat, precum și pentru profesionalismul, înțelegerea și răbdarea de care a dat dovadă.

Sincere și alese mulțumiri domnului ***Prof. dr. Sylvain Routier*** și domnului ***Conf. dr. Frédéric Buron*** de la Institutul de Chimie Organică și Analitică din cadrul Universității Orléans și Centrului Național de Cercetare Științifică (CNRS) Franța, pentru încrederea, înțelegerea, răbdarea și, nu în ultimul rând, pentru suportul științific acordat pe parcursul stagiului de mobilitate internațională.

Deosebite mulțumiri doamnei ***Prof. dr. Elena Cătălina Lupușoru***, șeful disciplinei de Farmacologie din cadrul Facultății de Medicină, pentru îndrumarea și sprijinul acordat în realizarea studiilor toxicologice și farmacologice.

Doresc să mulțumesc doamnei ***Conf. dr. Cristina Tuchiluș*** pentru sprijinul acordat în efectuarea și interpretarea testelor antimicrobiene.

Sincere mulțumiri comisiei de îndrumare a tezei de doctorat formată din doamna ***Prof. dr. Rodica Cuciureanu***, de la disciplina de Chimia Mediului și Alimentului, doamna ***Prof. dr. Anca Miron***, de la disciplina de Farmacognozie și domnului ***Conf. dr. Dan Lupașcu***, de la disciplina de Chimie Farmaceutică, pentru îndrumarea și sfaturile primite pe parcursul cercetării doctorale.

Doresc să aduc deosebite mulțumiri colegilor de la disciplina de Chimie Farmaceutică pentru sprijinul, înțelegerea, ajutorul necondiționat și sfaturile oferite de-a lungul celor patru ani de cercetare doctorală.

Nu în ultimul rând, doresc să mulțumesc familiei pentru sprijinul moral și înțelegerea de care au dat dovadă în toată perioada studiilor doctorale.

Această cercetare a fost parțial finanțată de proiectul POSDRU 159/1.5/S/136893 având titlul "Parteneriat strategic pentru creșterea calității cercetării științifice din universitățile medicale prin acordarea de burse doctorale și postdoctorale – DocMed.Net_2.0", proiect cofinanțat din Fondul Social European prin Programul Operaţional Sectorial pentru Dezvoltarea Resurselor Umane 2007 – 2013. Alese mulțumiri întregii echipe de management a proiectului care mi-a oferit statutul de bursier în perioada aprilie 2014-septembrie 2015 și a susținut demersurile pentru efectuarea unui stagiu de mobilitate internațională pe o perioadă de 5 luni.

Capitolul 6

MOTIVAȚIA ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII PERSONALE

Diabetul zaharat (DZ) se numără printre cele mai grave afecțiuni cronice, fiind considerată o problemă gravă de sănătate publică în întreaga lume. La nivel mondial, diabetul zaharat cauzează anual aproape 4 milioane de decese, în timp ce alte 1,5 milioane de cazuri noi sunt diagnosticate, estimându-se că în anul 2040 o persoană din zece va suferi de această maladie.

Cea mai frecventă formă de diabet zaharat este diabetul zaharat de tip 2 (DZ tip 2), ce reprezintă 85% din cazurile diagnosticate, prevalența sa fiind în creștere în ultimele decenii.

Hiperglicemia cronică, definitorie pentru DZ, este cauză majoră pentru severe complicații la nivelul diferitelor organe sau țesuturi. Complicațiile produse pot fi acute (cetoacidoză diabetică, hipoglicemie) sau cronice, atât microvasculare (retinopatia, neuropatia și nefropatia diabetică, piciorul diabetic), cât și macrovasculare (afecțiuni cardiovasculare). Se consideră că aceste complicații pot fi evitate sau reduse în intensitate prin realizarea unui constant control glicemic.

Tratamentul DZ de tip 2 se instituie în funcţie de etapa evolutivă a bolii (durată şi severitate), incluzând diferite clase de substanțe farmaceutice: derivați de sulfoniluree, biguanide, inhibitori ai alfa-glucozidazei, glinide, tiazolidindione și modulatori ai incretinelor (agoniști ai receptorilor GLP-1 și inhibitori ai enzimei DPP IV).

În terapia actuală cele mai utilizate medicamente aparţin clasei de sulfoniluree și biguanide. În ciuda eficienței terapeutice, deseori aceste medicamente au fost asociate cu numeroase efecte adverse, precum hipoglicemie, tulburări gastrointestinale, reacții alergice cutanate, tulburări hematologice, creștere ponderală, dar și acidoză lactică (în special în cazul biguanidelor).

O clasă relativ nouă de antidiabetice orale este reprezentată de tiazolidindione (pioglitazona, rosiglitazona și lobeglitazona), care, deși au dovedit un efect hipoglicemiant pronunțat, induc, din păcate, și serioase efecte adverse, precum hepatotoxicitate, risc cancerigen și cardiotoxic, creștere în greutate, fracturi la nivelul extremităților,

retenție de lichide și edeme maculare. Din aceste motive, primul reprezentant al clasei, troglitazona, a fost retras din terapeutică datorită riscului hepatotoxic, iar rosiglitazona se recomandă cu prudență datorită riscului cardiovascular pronunțat.

Cele mai noi alternative terapeutice sunt reprezentate de agoniştii receptorilor GLP-1, şi inhibitorii enzimei DPP IV. Aceste medicamente prezintă avantajul unui risc scăzut de hipoglicemie și al unui profil toxicologic mai redus; cele mai semnalate reacții adverse fiind greața, vărsăturile, cefalea, infecțiile tractului respirator și urinar și, rareori, pancreatita și cancerul tiroidian (liraglutidă).

Incidența îngrijorătoare a acestei afecțiuni metabolice cronice, dublată de nesiguranța terapiei actuale suscită interesul cercetătorilor pentru dezvoltarea de noi agenți terapeutici cu un profil farmacologic îmbunătățit, dar și cu efecte secundare reduse.

Scopul principal al cercetărilor din cadrul tezei de doctorat a fost reprezentat de ***sinteza unor noi derivaţi de tiazolidin-4-onă cu potenţială utilizare în tratamentul diabetului zaharat de tip 2.***

Compușii proiectați prezintă în structură două entități diferite: heterociclul de *tiazolidin-4-onă* și nucleul *xantinic*, ce pot imprima un mecanism dublu de acțiune, îmbunătățind astfel efectul terapeutic (Fig. 6.1).

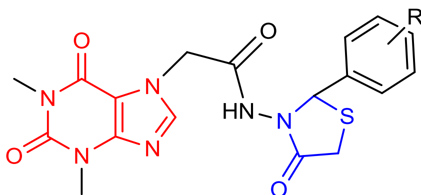


Fig. 6.1. Structura derivaților de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică **6a-k**.

Bazându-se pe reactivitatea structurii xantinice, de-a lungul timpului, au fost sintetizați noi derivați xantinici cu efecte terapeutice importante, precum: bronhodilatatore, anticancerose, antiinflamatoare și, nu în ultimul rând, hipoglicemiante. Importanța acestui nucleu în terapia diabetului zaharat este susținută de Linagliptină, un inhibitor de dipeptidil-peptidază IV, introdus recent în terapeutică care a dovedit atât proprietăți antidiabetice, cât și antioxidante.

Totodată, heterociclul de tiazolidin-4-onă a dovedit, la rândul său, importante efecte biologice. Date din literatura de specialitate atribuie acestei structuri diferite proprietăți, și anume antidiabetice, antioxidante, anticonvulsivante, antimicrobiene, antiinflamatoare, analgezice, antivirale și antitumorale.

Cele prezentate constituie argumente importante care au stat la baza proiectării derivaților de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică, cu potențial antidiabetic.

Studiile de cercetare realizate în cadrul tezei de doctorat au avut în vedere următoarele obiective:

- Sinteza și caracterizarea fizico-chimică și spectrală a unor noi derivați de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică; în realizarea acestui obiectiv fiind urmărite următoarele etape:
  - ✓ sinteza derivaților intermediari și finali și optimizarea condițiilor de reacție în vederea obținerii compușilor cu un randament ridicat și un grad de puritate avansat;
  - ✓ purificarea compușilor sintetizați prin diferite metode: recristalizare din solvenți adecvați, spălare cu diferiți solvenți, separare pe coloană de silicagel;
  - ✓ caracterizarea fizico-chimică a derivaților sintetizați, intermediari și finali (formulă moleculară, masa molară, randament de obținere, temperatură de topire, solubilitate în diferiți solvenți, factor de retenție);
  - ✓ caracterizarea biofarmaceutică a derivaților obținuți, utilizând metode computerizate de predicție, *in silico* (coeficientul de partiție octanol/apă, coeficientul de distribuție octanol/apă, capacitatea de absorbție la nivel digestiv, aria topologică a suprafeței polare);
  - ✓ confirmarea structurii chimice a tuturor compușilor sintetizați prin metode spectrale: IR, RMN (^{1}H-RMN, ^{13}C-RMN, ^{19}F-RMN, DEPT, 2D-COSY, HSQC, HMBC) și spectrometrie de masă de înaltă rezoluție (HRMS).
- Dezvoltarea de noi microsisteme pe bază de chitosan, obiectiv în cadrul căruia s-a avut în vedere:
  - ✓ optimizarea procedeului de formulare a microparticulelor de chitosan și a celor de chitosan – substanță activă;
  - ✓ caracterizarea morfologică și fizico-chimică a microparticulelor obținute (aspect, dimensiune, randament de obținere, procent de încărcare, eficiența încapsulării,

grad de umflare, capacitate de cedare a substanței active din matricea de chitosan);
- ✓ confirmarea componenței microparticulelor de chitosan – substanță activă prin spectroscopie în IR.

- Evaluarea potențialului biologic al derivaților de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică, prin:
  - ✓ evaluarea *in vitro* a potențialului antioxidant, prin determinarea efectului de inhibare a radicalilor DPPH și ABTS și a capacității totale antioxidante;
  - ✓ evaluarea *in vitro* a potențialului antimicrobian, prin determinarea efectului antibacterian și antifungic (diametrul zonei de inhibiție, concentrația minimă inhibitorie, concentrația minimă bactericidă/fungicidă);
  - ✓ evaluarea *in vivo* a potențialului toxic, prin determinarea dozei letale 50;
  - ✓ evaluarea *in vivo* a potențialului antidiabetic pe model de diabet zaharat indus cu streptozotocin la șobolan.

Capitolul 7

SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA UNOR NOI DERIVAȚI DE TIAZOLIDIN-4-ONĂ CU STRUCTURĂ XANTINICĂ

7.2.1. Sinteza și caracterizarea derivaților de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică

Sinteza derivaților de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică s-a realizat în mai multe etape, având ca și compus de plecare teofilina, conform schemei de reacție prezentată în Fig. 7.1:

- obținerea sării de sodiu a teofilinei **(2)** în urma reacției dintre teofilină **(1)** și sodiu metalic;
- substituția nucleofilă a sării de sodiu a teofilinei cu cloracetatul de etil, rezultând teofilin- acetatul de etil **(3)**;
- obținerea teofilin-acethidrazidei **(4)** prin tratarea esterului etilic al teofilinei cu un exces de hidrat de hidrazină;
- condensarea teofilin-acethidrazidei cu diferite aldehide aromatice (benzaldehida, 4-clor/ 4-brom/ 4-fluor/ 4-metil/ 4-

ciano/ 2-hidroxi/ 3-hidroxi /4-hidroxi/ 3-nitro/ 4-nitro/ 2-metoxi/ 3-metoxi/ 4-metoxi/ 2,3-dimetoxi/ 2,4-dimetoxi/ 2,5-dimetoxi/ 2,6-dimetoxi/ 3,4-dimetoxi/ 3,5-dimetoxi/ 2,3,4-trimetoxi/ 2,4,5-trimetoxi/ 2,4,6-trimetoxi/ 3,4,5-trimetoxibenzaldehida), rezultând hidrazonele corespunzătoare **(5a-y)**;

- ciclizarea hidrazonelor **5a-k** în prezența acidului tioglicolic, cu obținerea de noi derivați de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică **(6a-k)**.

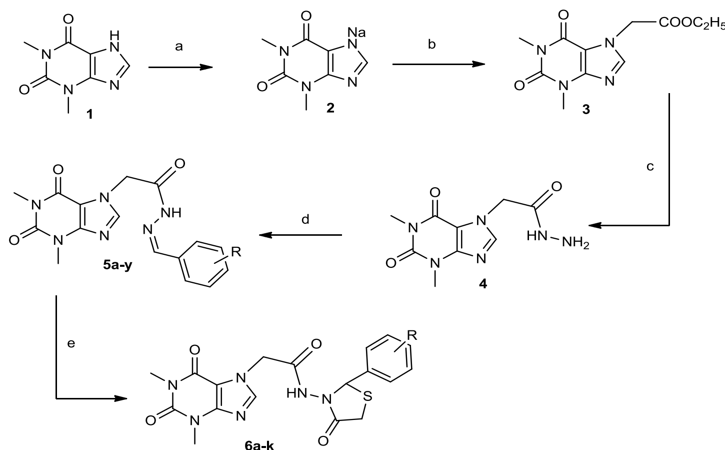


Fig. 7.1. Schema generală de sinteză a derivaților de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică. *Reactivi:* (a) sodiu metalic; (b) cloracetat de etil; (c) hidrat de hidrazină 64%; (d) diferite aldehide aromatice; (e) acid tioglicolic.

Monitorizarea reacțiilor de sinteză s-a realizat prin cromatografie pe strat subțire, utilizând ca fază mobilă diferite amestecuri de solvenți - diclormetan:alcool metilic 9,6:0,4; acetat de etil:acetonă 7,5:3,0 și acetat de etil:alcool metilic 9,6:0,4. Evidențierea spoturilor fiecărui compus s-a realizat în lumină UV, la lungimea de undă de 254 nm.

Pentru purificarea compușilor sintetizați, s-au utilizat mai multe metode. În cazul compușilor intermediari, purificarea s-a realizat prin recristalizare din alcool etilic sau prin spălare cu eter etilic și n-pentan. Derivații finali au fost separați pe coloană de silicagel, utilizând drept solvent acetatul de etil 100%, monitorizarea acestui proces realizându-se prin cromatografie pe strat subțire cu ajutorul sistemului de solvenți acetat de etil:alcool metilic 9,6:0,4.

În urma modulării structurale a teofilinei s-au obținut 27 compuși intermediari (**2**, **3**, **4**, **5a-y**) și 11 compuși finali, derivați de tiazolidin-4 onă cu structură xantinică (**6a-k**).

Caracterizarea fizico-chimică a derivaților sintetizați s-a realizat prin determinarea următorilor parametri: formula moleculară, masa relativă, randamentul de reacție, temperatura de topire, valoarea Rf și solubilitatea în apă și în diferiți solvenți organici.

Derivații finali se prezintă sub formă de pulberi albe sau gălbuie, cu temperatura de topire cuprinsă între 199 și 275 ºC, în funcție de structura compusului. În urma optimizării condițiilor de reacție, compușii au fost obținuți în randamente cuprinse între 6% și 54% (Tabel 7.7).

Tabel 7.7. Caracteristicile fizico-chimice ale derivaților de N-(R-fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onă **(6a-k)**

Compus	R	Formulă moleculară	Masa relativă (g/mol)	P.t. (ºC)	η (%)	Rf *	Solubilitate
6a	H	$C_{18}H_{18}N_6O_4S$	414,44	251-252	50	0,20	compușii sunt solubili la cald în cloroform, diclormetan, acetat de etil, dioxan, DMFA, DMSO; insolubili în apă, alcool metilic, alcool etilic 50% și 96%, acetonă, eter etilic
6b	4-Br	$C_{18}H_{17}BrN_6O_4S$	493,34	273-275	30	0,21	
6c	4-Cl	$C_{18}H_{17}ClN_6O_4S$	448,88	263-266	29	0,20	
6d	4-F	$C_{18}H_{17}FN_6O_4S$	432,43	262	28	0,18	
6e**	2-OCH_3	$C_{19}H_{20}N_6O_5S$	444,47	209-210	33	0,18	
6f	4-OCH_3	$C_{19}H_{20}N_6O_5S$	444,47	239-240	37	0,18	
6g**	3-OCH_3	$C_{19}H_{20}N_6O_5S$	444,47	199	50	0,18	
6h**	2,3-diOCH_3	$C_{20}H_{22}N_6O_6S$	474,49	247	50	0,18	
6i	2,4-diOCH_3	$C_{20}H_{22}N_6O_6S$	474,49	222	6	0,18	
6j	3,5-diOCH_3	$C_{20}H_{22}N_6O_6S$	474,49	247	54	0,20	
6k**	4-CH_3	$C_{19}H_{20}N_6O_4S$	428,47	256	52	0,20	

* acetat de etil:alcool metilic= 9,6:0,4 v/v; **solubil la rece în cloroform, diclormetan, DMSO

7.2.2. Caracterizarea biofarmaceutică a derivaților de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică

Caracterizarea biofarmaceutică a compușilor sintetizați s-a realizat *in silico*, utilizând metode computerizate de predicție. Studiul a presupus determinarea coeficientului de partiție octanol/apă estimat prin două modele, coeficientul de distribuție octanol/apă, capacitatea de absorbție la nivel digestiv și aria topologică a suprafeței polare. În seria derivaților N-(R-fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onă (**6a-k**) s-au evidențiat reprezentanții ce prezintă drept substituenți pe nucleul aromatic atașat heterociclului de tiazolidin-4-onă radicalii *brom* (**6b**), *clor* (**6c**), *fluor* (**6d**) și *metil* (**6k**). Valorile estimate pentru acești derivați sugerează un profil farmacocinetic optim, cu un caracter lipofil mediu ce permite atât traversarea membranelor celulare, cât și absorbția la nivel digestiv.

Tabel 7.12. Caracteristicile biofarmaceutice ale derivaților de N-(R-fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onă **(6a-k)**

Compus	R	Mlog P	S+log P	S+log D	Condiții neîndeplinite în Regula lui *Lipinski*	Masa molară (g/mol)	M_NO	T_PSA	HBDB
6a	H	1,073	0,175	0,174	0	414,445	10	111,23	1
6b	4-Br	1,687	0,808	0,807	0	493,346	10	111,23	1
6c	4-Cl	1,573	0,779	0,777	0	448,89	10	111,23	1
6d	4-F	1,458	0,551	0,549	0	432,435	10	111,23	1
6e	2-OCH_3	0,85	0,388	0,387	M_NO	444,471	11	120,46	1
6f	4-OCH_3	0,85	0,448	0,447	M_NO	444,471	11	120,46	1
6g	3-OCH_3	0,85	0,411	0,410	M_NO	444,471	11	120,46	1
6h	2,3-diOCH_3	0,628	0,607	0,606	M_NO	474,498	12	129,69	1
6i	2,4-diOCH_3	0,628	0,564	0,563	M_NO	474,498	12	129,69	1
6j	3,5-diOCH_3	0,628	0,581	0,581	M_NO	474,498	12	129,69	1
6k	4-CH_3	1,305	0,51	0,509	0	428,472	10	111,23	1

Capitolul 8

CONFIRMAREA STRUCTURII CHIMICE A DERIVAȚILOR DE TIAZOLIDIN-4-ONĂ CU STRUCTURĂ XANTINICĂ

Reușita modulării structurale practicată în chimia organică este stabilită prin confirmarea structurii chimice a compușilor sintetizați. În acest sens, structura compușilor intermediari și finali sintetizați a fost confirmată prin diferite metode spectrale: spectroscopia de absorbție în infraroșu, spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară (RMN) de proton (^{1}H-RMN), de carbon (^{13}C-RMN, DEPT), de fluor (^{19}F-RMN), de proton-proton (2D-COSY) și de proton-carbon (HSQC, HMBC), precum și spectrometria de masă de înaltă rezoluție (HRMS).

8.2.1. Spectroscopia de absorbție în infraroșu

Obținerea cantitativă a teofilinatului sodic (**2**) s-a evidențiat prin dispariția picurilor specifice legăturii NH în regiunea 2900-3100 cm^{-1}, ceea ce confirmă astfel înlocuirea protonului din poziția 7 cu atomul de sodiu.

Gruparea esterică din cadrul teofilin-esterului (**3**) fost identificată prin benzile de absorbție caracteristice vibrațiilor de valență ale grupării carbonil (1643 cm^{-1}) și legăturii C-O-C (1184 cm^{-1}). Vibrațiile caracteristice grupării etil au apărut sub formă de benzi de absorbție la 1470 cm^{-1} și 1369 cm^{-1} precum și la 1018 cm^{-1} și 777 cm^{-1}.

Confirmarea obținerii teofilin-acethidrazidei (**4**) s-a realizat prin apariția benzilor de absorbție specifice grupării amidice la 1644 cm^{-1} (C=O) și 1229 cm^{-1} (C-N).

Formarea grupării azometinice (N=CH) din cadrul hidrazonelor **5a-y** a fost evidențiată prin vibrațiile puternice de întindere în domeniul 1610-1544cm^{-1}.

Succesul reacției de ciclizare dintre hidrazonele **5a-k** și acidul tioglicolic și formarea derivaților de tiazolidin-4-onă **6a-k** au fost confirmate prin dispariția benzilor de absorbție caracteristice legăturii azometinice și apariția celor specifice grupării C=O din ciclu în regiunea 1701-1682 cm^{-1}, legăturii C-S în intervalul 695-665cm^{-1} și grupării metilenice ciclice a cărei vibrație de întindere s-a evidențiat între 2991 și 2920 cm^{-1}. Spre exemplificare, în Fig. 8.7 este prezentat spectrul IR al derivatului N-fenil-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onă (**6a**).

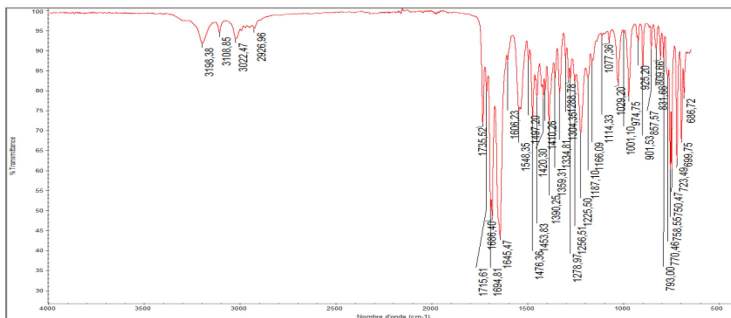


Fig. 8.7. Spectrul IR al N-fenil-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onei (**6a**).

8.2.2. Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară

Transformarea teofilinei în sare de sodiu a fost dovedită prin spectrul ^{1}H-RMN, ce evidențiază dispariția semnalului protonului de la atomul de azot din poziția 7. În spectrele ^{1}H-RMN, ^{13}C-RMN și DEPT înregistrate pentru acest compus s-au regăsit toate caracteristicile spectrale menționate în literatura de specialitate, ceea ce confirmă reușita reacției.

Succesul reacției de substituție nucleofilă este susținut de spectrul ^{1}H-RMN, protonii grupărilor metil și metilen din radicalul etil fiind evidențiați la frecvența de 4,17 ppm ($-CH_2-$) și 1,21 ppm ($-CH_3$). Carbonul cuaternar din secvența esterică s-a identificat în domeniul 106,78-168,08 ppm, în timp ce deplasarea chimică a carbonilor din restul etil a fost observată la 61,83 ppm ($-CH_2-$) și respectiv 14,46 ppm ($-CH_3$).

Sinteza teofilin-acethidrazinei **(4)** a fost confirmată prin prezența, pe spectrul ^{1}H-RMN, a protonului specific regiunii amidice (CO-NH) la frecvența de 9,33/8,73 ppm, și a protonilor din gruparea amino cu o deplasare chimică redusă (4,28/4,53 ppm). S-au evidențiat două seturi de semnale, ceea ce sugerează faptul că derivatul s-a obținut sub formă de amestec tautomeric, raportul dintre cele două forme fiind de 9/1. Semnalul carbonului cuaternar din legătura hidrazidică (C=O) a fost observat în spectrul ^{13}C-RMN în regiunea carbonilor cuaternari aromatici (106,85-166,08 ppm).

Condensarea hidrazidei (**4**) cu diferite aldehide aromatice a condus la formarea hidrazonelor **5a-y** sub formă de amestec de doi izomeri în raport de 9/1, 8/2 sau 7/3, ce se află în echilibru dinamic. În spectrul ^{1}H-RMN, protonul grupării azometinice a rezonat în intervalul 7,94-8,52/8,02-8,53 ppm, în timp ce protonii nucleului aromatic în regiunea 6,27-8,34 ppm pentru ambele forme tautomere. Spectrul ^{13}C-RMN a evidențiat deplasarea chimică a carbonului grupării azometinice în intervalul 139,85-148,89 ppm, dar și semnalul carbonilor terțiari din secvența aromatică la 91,66-140,54 ppm pentru hidrazonă și respectiv 91,37-143,34 ppm pentru forma sa tautomeră. În cazul compusului **5d**, spectrul ^{19}F-RMN, a înregistrat două picuri ascuțite, la -110,54 ppm și respectiv la -110,42 ppm, corespunzătoare celor două forme tautomere.

Formarea nucleului de tiazolidin-4-onă din structura derivaților **6a-k** a fost confirmată și de spectrele ^{1}H-RMN și ^{13}C-RMN. În spectrul ^{1}H-RMN s-au identificat semnalul dat de protonul grupării metinice (N-CH-S) în regiunea 5,75-6,10 ppm și cele date de protonii grupării metilenice (CH_2-S) la 3,72-3,80 ppm. Deplasările chimice corespunzătoare carbonilor (^{13}C-RMN) din cele două grupări funcționale au fost evidențiate în domeniul 56,95-61,79 ppm și respectiv 19,98-30,16 ppm. În ambele spectre s-au identificat și semnalele corespunzătoare secvenței aromatice ce substituie nucleul de tiazolidin-4-onă, precum și ale substituenților corespunzători de pe nucleul aromatic. Spectrul ^{19}F-RMN realizat în cazul derivatului

6d a confirmat prezența atomului de fluor, semnalul acestuia fiind identificat la -110,6 ppm.

Datele spectrale furnizate de spectrele ^{1}H-RMN au fost validate de spectrele bidimensionale 2D-COSY ce dovedesc corelația proton-proton, în timp ce informațiile obținute în urma analizei spectrelor ^{13}C-RMN au fost întărite de spectrul DEPT care diferențiază carbonii secundari de cei primari și terțiari. Spectrele bidimensionale HSQC au înregistrat cuplările dintre protonii și carbonii de care se leagă, în timp ce spectrele HMBC au evidențiat corespondența dintre carbonii și protonii aflați la distanță.

Spre exemplificare în Fig. 8.29-8.34 sunt prezentate caracteristicile spectrale ^{1}H-RMN, 2D-COSY, ^{13}C-RMN, DEPT, HSQC, HMBC ale derivatului N-(4-metoxi-fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid] tiazolidin-4-ona (**6f**).

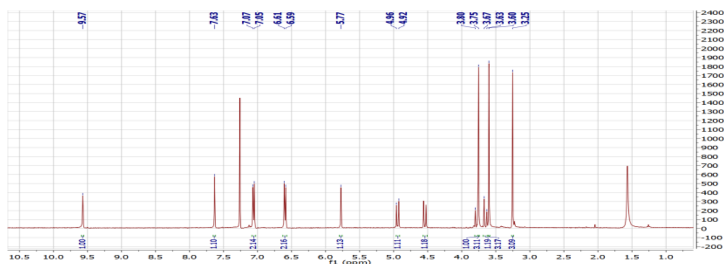


Fig. 8.29. Spectrul ^{1}H-RMN al N-(4-metoxi-fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onei (**6f**).

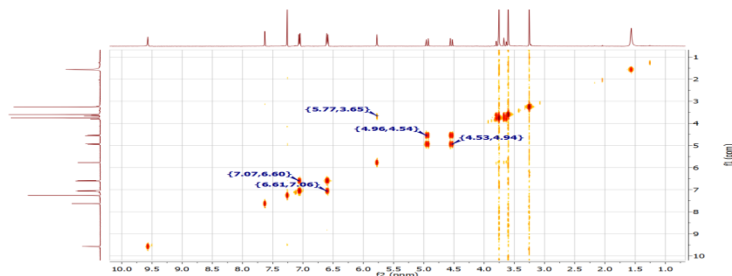


Fig. 8.30. Spectrul 2D-COSY al N-(4-metoxi-fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onei (**6f**).

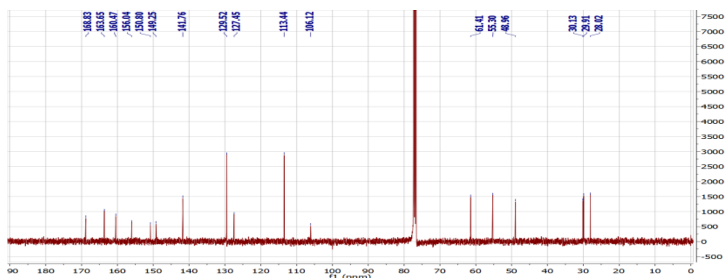


Fig. 8.31. Spectrul ^{13}C-RMN al N-(4-metoxi-fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onei (**6f**).

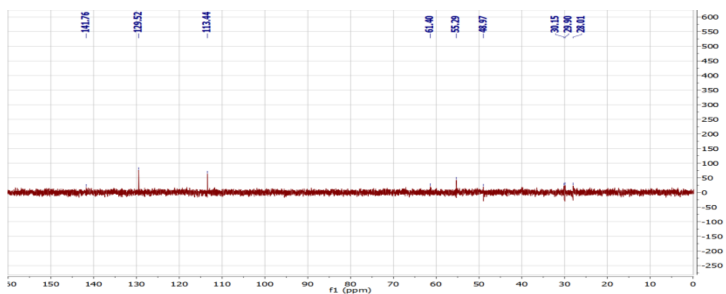


Fig. 8.32. Spectrul DEPT al N-(4-metoxi-fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onei (**6f**).

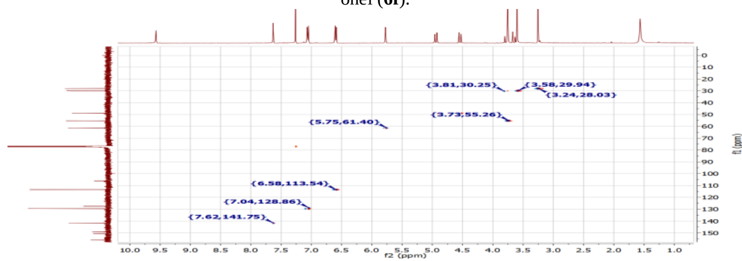


Fig. 8.33. Spectrul HSQC al N-(4-metoxi-fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onei (**6f**).

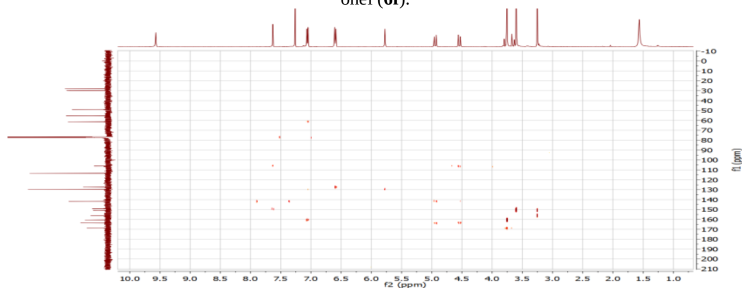


Fig. 8.34. Spectrul HMBC al N-(4-metoxi-fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onei (**6f**).

8.2.3. Spectroscopia de masă de înaltă rezoluție

Validarea reacțiilor din cadrul sintezei derivaților de tiazolidin-4-onă a fost realizată de spectrele de masă de înaltă rezoluție, care au confirmat masa moleculară, formula chimică și structura compușilor sintetizați. Valorile raportului *m/z* înregistrate de spectrul de masă fiind similare cu valorile obținute prin calcul teoretic.

În cazul compușilor finali (**6a-k**), picurile ionilor moleculari au fost identificate în regiunea 415,1182-493,0283, valorile înregistrate fiind similare celor obținute prin calcul teoretic (415,1183-493,0288). Raportul *m/z* $[M+Na]^+$ a fost înregistrat pe spectrul de masă pentru cinci derivați (derivații **6d** și **6f-i**), variind între 455,0904-497,1216, în timp ce valoarea teoretică s-a situat în regiunea 455,0908-497,1214.

Spre exemplificare, în Fig. 8.41 este prezentat spectrul de masă al N-(4-metoxi-fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onei (**6k**).

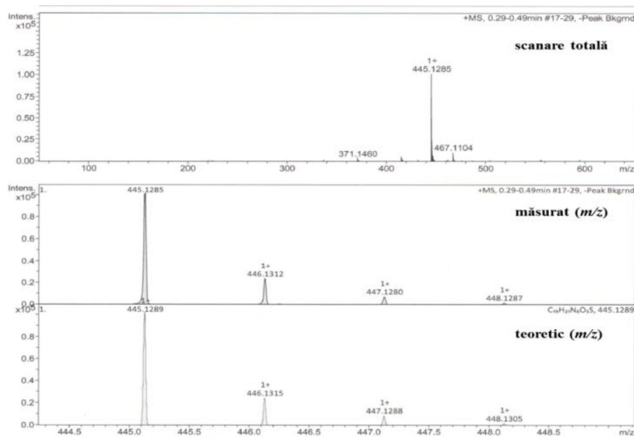


Fig. 8.41. Spectrul de masă al N-(4-metoxi-fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onei (**6k**).

Capitolul 9

DEZVOLTAREA DE MICROSISTEME PE BAZĂ DE CHITOSAN

Dezvoltarea de noi microsisteme pe bază de chitosan a suscitat în ultima perioadă interesul cercetătorilor datorită numeroaselor beneficii aduse efectului terapeutic al diferitelor substanțe. Cel mai important avantaj este reprezentat de eliberarea controlată a substanței medicamentoase ce are ca efect îmbunătățirea potențialului biologic. De asemenea, proprietățile unice ale acestui biopolimer (toxicitate redusă, biocompatibilitate și biodegradare) contribuie la utilizarea din ce în ce mai frecventă a microparticulelor în numeroase aplicații din domeniul medical și farmaceutic.

9.2.1. Microparticule de chitosan

Obținerea microparticulelor de chitosan (MCH) s-a realizat prin procesul de reticulare ionică, utilizând ca și agent de reticulare tripolifosfatul pentasodic. În urma optimizării procedeului de formulare, s-au stabilit cele mai bune condiții pentru obținerea de microparticule stabile: concentrația soluției de chitosan (1,2%, 1,5%, 1,7%), concentrația soluției de TPP (2%), reticulare prin agitare timp de 8 ore.

9.2.2. Microparticule de chitosan – substanță activă

Derivații N-(4-*clor*fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid] tiazolidin-4-onă (**6c**), N-(2-*metoxi*fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onă (**6e**), N-(4-*metoxi*fenil)-3-[(1,3-dimetil xantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onă (**6f**), N-(4-*metil*fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onă (**6k**) au fost înglobați în matricea de chitosan în diferite concentrații: 3 mg/mL (MCH – $\mathbf{6c_1}$, MCH – $\mathbf{6e_1}$, MCH – $\mathbf{6f_1}$, MCH – $\mathbf{6k_1}$), 4 mg/mL (MCH – $\mathbf{6c_2}$, MCH – $\mathbf{6e_2}$, MCH – $\mathbf{6f_2}$, MCH – $\mathbf{6k_2}$) și 5 mg/mL (MCH – $\mathbf{6c_3}$, MCH – $\mathbf{6e_3}$, MCH – $\mathbf{6f_3}$, MCH – $\mathbf{6k_3}$) raportat la soluția de chitosan. În vederea obținerii de microparticule stabile s-au selectat următorii parametri: soluție chitosan 1,7%, soluție TPP 2%, reticulare prin agitare timp de 8 ore.

9.2.3. Caracterizarea microparticulelor de chitosan – substanță activă

Microparticulele de chitosan – substanță activă obținute au fost caracterizate din punct de vedere morfologic, stabilindu-se totodată eficiența încapsulării, randamentul de obținere, procentul de încărcare, precum și capacitatea de umflare și cedare a substanței încorporate în diferite medii (mediul gastric și intestinal).

9.2.3.1. Caracterizarea morfologică a microparticulelor de chitosan – substanță activă

În urma studiului morfologic, s-a observat că microparticulele de chitosan prezintă culoare alb-gălbuie, formă sferică, contur regulat și suprafață ușor rugoasă în comparație cu microparticulele de chitosan – substanță activă care înregistrează modificări ale acestor proprietăți ce se intensifică o dată cu creșterea concentrației (Fig. 9.1).

Astfel, cele mai intense modificări s-au observat în cazul microparticulelor chitosan – substanță activă, în concentrație de 5 mg/mL, printre care cea mai importantă este pierderea formei sferice și apariția fenomenului de aplatizare. Cea mai pronunțată aplatizare s-a observat în cazul MCH – **6c$_3$**, cu o dimensiune medie a particulelor în stare uscată de 855 µm.

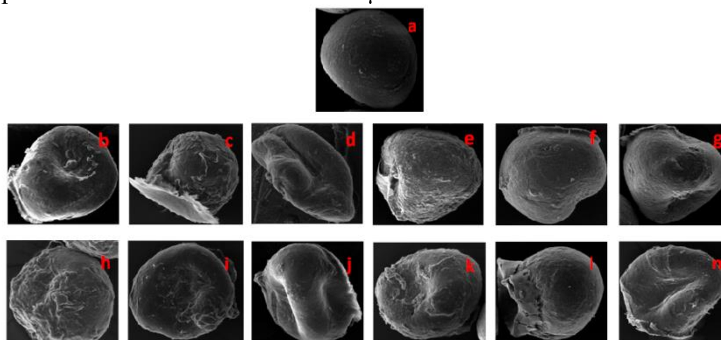


Fig. 9.1. Imagini SEM ale microparticulelor de chitosan și chitosan – substanță activă (a: MCH, b: MCH - **6c$_1$**, c: MCH - **6c$_2$**, d: MCH - **6c$_3$**, e: MCH - **6e$_1$**, f: MCH - **6e$_2$**, g: MCH - **6e$_3$**, h: MCH - **6f$_1$**, i: MCH - **6f$_2$**, j: MCH - **6f$_3$**, k: MCH - **6k$_1$**, l: MCH - **6k$_2$**, m: MCH - **6k$_3$**).

9.2.3.3. Procentul de încărcare și eficiența încapsulării substanței active în matricea de chitosan

Determinarea concentrației de substanță activă rămasă neîncapsulată s-a realizat spectrofotometric pe baza curbei de

calibrare specifică fiecărui compus. Cantitatea de substanță activă încapsulată în matricea de chitosan este reprezentată de diferența dintre cantitatea de substanță inițială și cea neîncapsulată. Aceasta a fost utilizată pentru determinarea eficienței încapsulării și procentului de încărcare, valorile obținute fiind prezentate în Fig. 9.4-9.5.

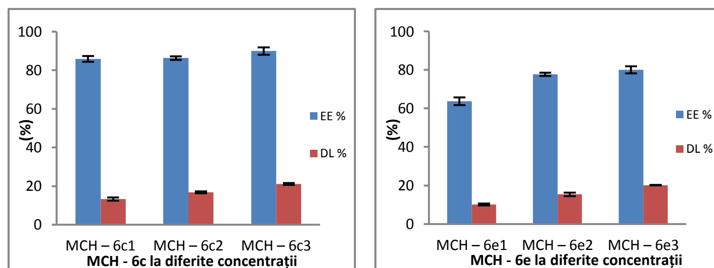


Fig. 9.4. Eficiența încapsulării și procentul de încărcare pentru microparticulele MCH – **6c** și MCH – **6e** (MCH-6c_1/6e_1 – 3 mg/mL; MCH-6c_2/6e_2 – 4 mg/mL; MCH-6c_3/6e_3 – 5 mg/mL).

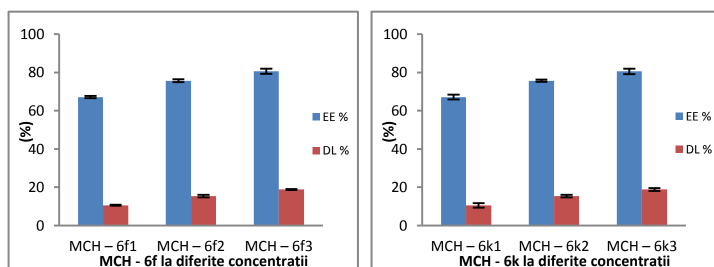


Fig. 9.5. Eficiența încapsulării și procentul de încărcare pentru microparticulele MCH – **6f** și MCH – **6k** (MCH-6f_1/6k_1 – 3 mg/mL; MCH-6f_2/6k_2 – 4 mg/mL; MCH-6f_3/k_3 – 5 mg/mL).

Datele obținute evidențiază o eficiență a încapsulării (EE%) substanțelor active crescută, cuprinsă între 63,71% (MCH – **6e$_1$**) și 93,91% (MCH – **6k$_3$**), acest parametru variind direct proporțional cu creșterea concentrației. Se observă că cea mai bună încapsulare în matricea de chitosan, la toate concentrațiile testate, s-a obținut în cazul derivatului **6k** (N-(4-*metil*fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onă, și anume 87,86±1,25% (3 mg/mL), 91,58±0,55% (4 mg/mL), 93,91±1,41% (5 mg/mL). Derivații ce conțin gruparea *metoxi* hidrofilă pe nucleul aromatic, atât în poziția *orto* (**6e**), cât și în *para* (**6f**), au prezentat o eficiență a încapsulării mai scăzută.

Referitor la procentul de încărcare (DL%) a substanței active în masa de microparticule de chitosan – substanță activă, s-a constatat că acesta crește direct proporțional cu concentrația. Aceste rezultate sunt în concordanță cu valorile obținute pentru EE%, confirmând astfel corectitudinea studiului. Cel mai mare procent de încărcare a fost obținut în cazul compusului **6k** la o concentrație de 5 mg/mL (22,02±0,74%).

Analizând comparativ datele obținute în urma celor două teste efectuate, se poate afirma faptul că cea mai benefică formulare pentru obținerea microparticulelor de chitosan – substanță activă este formularea ce conține substanță activă în concentrație de 5 mg/mL.

9.2.3.4. Analiza spectrală în IR

Confirmarea procesului de încapsulare s-a realizat și prin evidențierea în spectrul IR al microparticulelor chitosan-substanță activă a celor două componente, respectiv grupările funcționale specifice chitosanului și cele ale derivaților de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică înglobați, precum și a agentului de reticulare.

Agentul de reticulare, tripolifosfatul pentasodic, a fost identificat prin benzile de absorbție specifice, în regiunile 1151-1149 cm^{-1} (P=O) și 895-893 cm^{-1} (P-O-P).

Vibrațiile legăturilor și grupărilor funcționale specifice chitosanului au fost identificate în următoarele regiuni: 3362-3285 cm^{-1} (-OH, -NH), 2981-2872 cm^{-1}, 1431-1414 cm^{-1} și 1377-1375 cm^{-1} (-CH_2-, -CH_3), 1661-1647 cm^{-1} (C=O), 1267-1250 cm^{-1} (C-N), 1034-1026 cm^{-1} (C-O-C).

Prezența substanței active, respectiv a derivaților de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică (**6c**, **6e**, **6f** și **6k**), în matricea polimerică a fost confirmată prin identificarea următoarelor benzi de absorbție caracteristice: legăturii NH (3362-3285 cm^{-1}), heterociclului de tiazolidin-4-onă, în regiunile 2981-2872 cm^{-1} (-CH_2-), 1724-1711 cm^{-1} (C=O), 671-660 cm^{-1} (C-S), nucleului aromatic prin legăturile =C-H (3362-3285 cm^{-1}, 810-746 cm^{-1}) și C=C (1558-1549 cm^{-1} și 1494-1452 cm^{-1}), grupării amidice ce se suprapun cu vibrațiile de valență ale aceleași grupări din structura chitosanului, substituenților la 1063-1059 cm^{-1} (C-O din gruparea metoxi în cazul **6e**, **6f** și **6k**), 822-818 cm^{-1} (-Cl în cazul **6c**) și 1377-1375 cm^{-1} (gruparea metil în cazul **6e**, **6f** și **6k)**.

Spre exemplificare, în Fig. 9.9 este prezentat spectrul IR al microparticulelor de chitosan-substanță activă **6k** la diferite concentrații, comparativ cu spectrul chitosanului și al substanței **6k**.

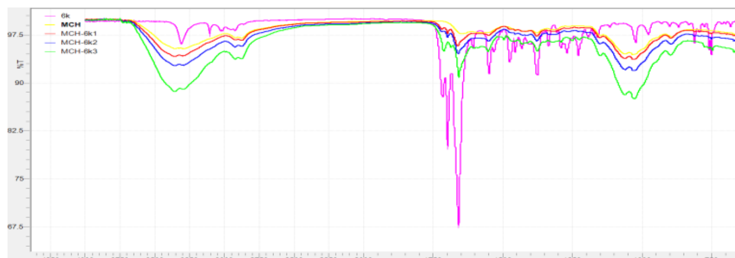


Fig. 9.9. Spectrul IR al MCH-6k la diferite concentrații (MCH – $6k_1$: 3 mg/mL, MCH – $6k_2$: 4 mg/mL, MCH – $6k_3$: 5 mg/mL).

Capitolul 10

EVALUAREA BIOLOGICĂ A DERIVAȚILOR DE TIAZOLIDIN-4-ONĂ CU STRUCTURĂ XANTINICĂ

10.1. Evaluarea acțiunii antioxidante

Activitatea antioxidantă a derivaților de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică a fost evaluată utilizând trei metode *in vitro:*

- capacitatea antiradicalică față de radicalul 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH);
- capacitatea antiradicalică față de radicalul cation acid 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic) ($ABTS^{\cdot+}$);
- capacitatea totală antioxidantă prin metoda cu reactivul fosfomolibdenic.

10.1.2. Rezultate și discuții

În continuare sunt prezentate rezultatele obținute prin evaluarea efectului antiradicalic față de radicalul DPPH după 30 min.

10.1.2.1. Efectul antiradicalic față de radicalul DPPH

Această metodă a fost utilizată pentru evaluarea potențialului antioxidant al compușilor sintetizați, derivați de hidrazonă și

tiazolidin-4-onă, la două intervale de timp: 30 min (pentru **5a-y** și **6a-k**, cu excepția **5q** și **5y** care au precipitat pe perioada experimentului) și 60 min (pentru **5a-k** și **6a-k**).

Efectul antiradicalic față de radicalul DPPH după 30 min

Din analiza rezultatelor înregistrate pentru *derivații de hidrazonă* s-a constatat că activitatea antiradicalică față de radicalul DPPH se intensifică prin creșterea concentrației, de la 0,4 mg/ml la 2,0 mg/ml (Fig. 10.2). Derivatul **5l** (R=4-NO_2) a prezentat cea mai puternică activitate antiradicalică asupra DPPH, cu un procent de inhibiție de 47,99±0,22% la concentrația de 2,0 mg/ml, fiind de aproximativ de 4 ori mai activ decât teofilina (12,14±0,20%). Acțiune apreciabilă au dovedit și compușii trimetoxilați, **5v** (R=2,4,5-triOCH_3; 37,78±0,26%) și **5x** (R=3,4,5-triOCH_3; 33,82 ±0,26%), aceștia fiind de aproximativ 3 ori mai activi decât compusul de plecare, susținând astfel faptul că derivatizarea teofilinei prin introducerea în poziția 7 a unei catene de benziliden-acethidrazină, concomitent cu substituția nucleului aromatic cu *nitro* în poziția *para*, și cu *metoxi* în pozițiile *orto*, *meta* și *para* determină intensificarea activității antioxidante a teofilinei.

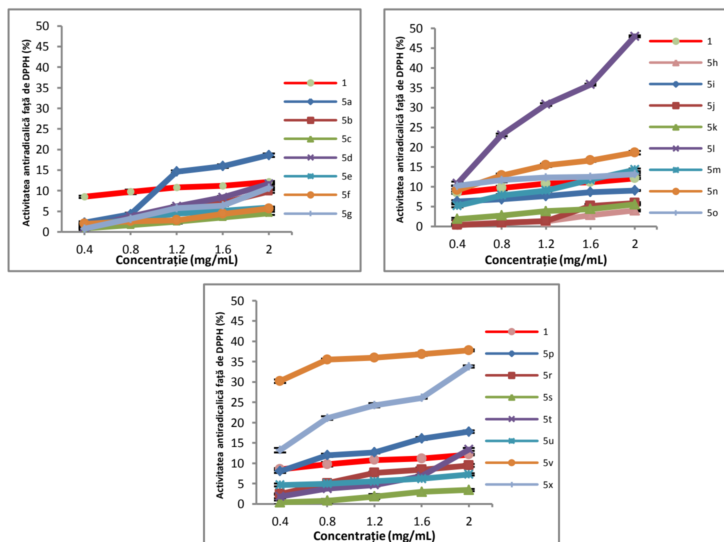


Fig.10.2. Activitatea antiradicalică față de DPPH (I%) a derivaților de N-(R-benziliden)-2-(1,3-dimetilxantin-7-il)acethidrazină **(5a-y)**, după 30 min.

Analizând datele obținute pentru *derivații de tiazolidin-4-onă* (**6a-k**) comparativ cu hidrazonele corespunzătoare (**5a-k**), se poate afirma că ciclizarea acestora cu acid tioglicolic, cu formarea ciclului de tiazolidin-4-onă, a determinat intensificarea efectului antioxidant al hidrazonelor. Totodată, toți acești derivați s-au dovedit a fi mai activi decât compusul părinte, teofilina (Fig.10.3).

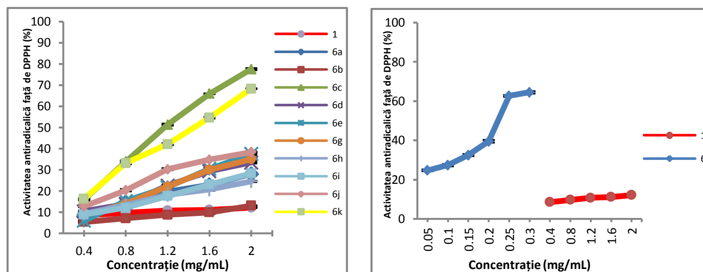


Fig.10.3. Activitatea antiradicalică față de DPPH (I%) a derivaților de N-(R-fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onă **(6a-k)**, după 30 min.

Similar derivaților de hidrazonă, și în cazul derivaților **6a-k** efectul antiradicalic a crescut cu concentrația, de la 0,4 mg/ml la 2,0 mg/ml, cele mai mari creșteri observându-se în cazul derivaților **6f** (R=4-OCH_3), **6c** (R=4-Cl) și **6k** (R=4-CH_3). În cazul derivatului **6f**, este important de precizat că a fost activ la concentrații mai mici de 0,4 mg/ml, efectul antiradicalic variind între 24,72±0,39% la concentrația de 0,05 mg/mL și 64,50±0,59% la concentrația de 0,3 mg/mL. Se poate aprecia că cei mai activi au fost derivații **6f**, **6c** și **6k**, pentru acești compuși fiind posibilă și calcularea valorii CE_{50}.

Compusul **6f** (CE_{50}=0,2212±0,0011 mg/mL), a prezentat un procent de inhibiție de 64,50±0,59% la concentrația de 0,3 mg/mL, concentrație de aproximativ 7 ori mai mică decât concentrația maximă la care au fost testați ceilalți derivați (2,0 mg/mL). La concentrația de 2,0 mg/mL, compușii **6c** (CE_{50}=1,1640±0,0123 mg/mL) și **6k** (CE_{50}=1,4389±0,0130mg/mL) au prezentat un procent de inhibiție de 77,53±0,47% și respectiv 68,28±0,19%, fiind de aproximativ 6,5 și, respectiv, 6 ori mai activi decât teofilina (12,14±0,20%).

Aceste date susțin faptul că prezența grupărilor metoxi, cloro sau metil în poziția *para* a nucleului aromatic atașat ciclului de tiazolidin-4-onă prezintă o influență favorabilă asupra activității de scavenger față de radicalul DPPH. O influență favorabilă s-a observat și în cazul substituției nucleului aromatic cu fluor în poziția

para, precum și cu gruparea metoxi în pozițiile *orto* și *meta*, derivații corespunzători **6d** (R=4-F), **6e** (R=2-OCH_3), **6g** (R=3-OCH_3) și **6j** (R=2,3-diOCH_3) fiind de aproximativ 3 ori mai activi decât compusul părinte, teofilina (**1**).

10.2. Determinarea activității antimicrobiene

Acțiunea antimicrobiană a compușilor a fost apreciată atât *calitativ*, prin evaluarea sensibilității microorganismelor la compușii testați, exprimată prin diametrul zonei de inhibiție a creșterii microbiene, respectiv fungice, cât și *cantitativ*, prin stabilirea valorii concentrației minime inhibitorii și a celei bactericide/fungicide.

10.2.2.2. Metoda microdiluțiilor în bulion

Această metodă ce exprimă activitatea antimicrobiană cantitativă a compușilor testați, completează informațiile furnizate de metoda difuzimetrică. Valorile CMI și a CMB, respectiv CMF, obținute pentru derivații **6a-k** sunt prezentate în Tabelul 10.14.

Tabel 10.14. Valorile CMI și CMB/CMF corespunzătoare derivaților N-(R-fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onă (**6a-k**)

Compus	***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**		***Escherichia coli* ATCC 25922**		***Candida albicans* ATCC 90028**	
	CMI (mg/mL)	**CMB (mg/mL)**	**CMI (mg/mL)**	**CMB (mg/mL)**	**CMI (mg/mL)**	**CMF (mg/mL)**
6a	0,625	10	1,25	1,25	1,25	1,25
6b	2,5	10	2,5	2,5	1,25	1,25
6c	2,5	10	1,25	1,25	1,25	2,5
6d	0,3125	10	1,25	2,5	2,5	2,5
6e	1,25	10	1,25	1,25	1,25	2,5
6f	0,625	10	1,25	2,5	2,5	2,5
6g	0,625	10	1,25	2,5	2,5	2,5
6h	1,25	5	2,5	2,5	2,5	2,5
6i	0,625	10	2,5	2,5	2,5	2,5
6j	0,625	10	1,25	2,5	2,5	2,5
6k	1,25	10	0,625	2,5	0,625	1,25
1	5	10	1,25	2,5	2,5	2,5
Ampicilină	1[1]	2[1]	2[1]	4[1]	nd[2]	nd[2]
Fluconazol	nd[2]	nd[2]	nd[2]	nd[2]	8[1]	16[1]

Cel mai activ pe tulpina de *Staphylococcus aureus* s-a dovedit a fi derivatul **6d** (R=4-F, CMI=0,3125 mg/mL, CMB=10 mg/mL) fiind de 16 ori mai activ decât teofilina (**1**, CMI=5 mg/mL, CMB=10 mg/mL). Aceste rezultate vin în sprijinul informațiilor furnizate de metoda difuzimetrică și întăresc observația conform căreia modularea structurală a nucleului xantinic prin atașarea ciclului de tiazolidin-4-onă cumulat cu substituția nucleului

aromatic cu fluor în poziția *para* intensifică efectul antibacterian pe tulpina de *Staphyloccoccus aureus*.

Pentru majoritatea compușilor testați nu s-au semnalat diferențe semnificative între valorile CMI și CMB pe tulpina de *Escherichia coli*. Dintre aceștia, compusul **6k** (R=4-CH_3) a prezentat cea mai mică valoare CMI (0,625 mg/mL), putându-se aprecia ca fiind de 2 ori mai activ decât compusul de bază (**1;** CMI=1,25 mg/mL). La rândul lor, derivații **6a** (R=H), **6c** (R=4-Cl) și **6e** (R=2-OCH_3), pentru care valoarea CMB a fost de 1,25 mg/ml, au dovedit o acțiune bactericidă de 2 ori mai intensă decât a teofilinei (CMB=2,5 mg/mL).

Compusul **6k** (R=4-CH_3) a dovedit a avea și activitate antifungică, valorile CMI (0,625 mg/mL) și CMF (1,25 mg/ml), înregistrate pentru tulpina *Candida albicans* fiind de 4 ori, respectiv 2 ori mai mici decât cele înregistrate pentru teofilină (CMI=CMF=2,5 mg/mL).

10.3. Evaluarea toxicității acute

Derivații de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică care s-au dovedit a fi cei mai activi din punct de vedere al potențialului antioxidant (**6c**, **6e**, **6f** și **6k**) au fost supuși unui screening toxicologic ce a urmărit evaluarea toxicității acute.

Datele obținute evidențiază faptul că cei patru derivați de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică se încadrează în clasa substanțelor slab toxice, doza letală 50 variind în intervalul 1312,5-2125 mg/kg corp. Aceștia sunt cu mult mai puțin toxici în comparație cu teofilina, compusul de plecare (DL_{50} = 332 mg /kg corp), ceea ce confirmă eficacitatea modulării structurale a nucleului xantinic prin introducerea unui heterociclu de tiazolidin-4-onă.

Compusul **6c** (R=4-Cl) a prezentat cea mai scăzută toxicitate acută (DL_{50} = 2125 mg/kg corp), fiind de aproximativ 6,5 ori mai puțin toxic decât teofilina, evidențiind faptul că prezența atomului de clor în poziția *para* a nucleului aromatic este importantă pentru siguranța profilului toxicologic. Derivații **6f** (DL_{50} = 1937,5 mg/kg corp), **6e** (DL_{50} = 1687,5 mg/kg corp) și **6k** (DL_{50} = 1312,5 mg/kg corp) sunt de 5,8; 5 și, respectiv, 4 ori mai puțin toxici decât compusul părinte. În raport pioglitazona, martorul pozitiv, se poate aprecia că derivații testați au dovedit un profil toxicologic îmbunătățit, fiind de 7,2 până la 11,7 ori mai puțin toxici.

10.4. Evaluarea acțiunii antidiabetice

Pe baza rezultatelor evaluării potențialului antioxidant prin metode *in vitro* și a screening-ului toxicologic, au fost selectați doi derivați de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică, în vederea evaluării potențialului antidiabetic: N-(4-*clor*fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-ona (**6c**) și N-(2-*metoxi*fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid] tiazolidin-4-onă (**6e**). Acești doi compuși au dovedit un efect antioxidant apreciabil și o valoare a DL_{50} ce le recomandă ca și substanțe slab toxice (**6c**, DL_{50} = 2125 mg/kg corp; **6e**, DL_{50} = 1687,5 mg/kg).

Evaluarea potențialului antidiabetic a fost realizată pe model de diabet zaharat indus cu streptozotocin la șobolan, prin determinarea următorilor parametri:

- *clinici* – greutate, consum de hrană, consum de apă;
- *biochimici* – glicemie postprandială, hemoglobină glicată, funcția renală (creatinină, uree și acid uric), funcția hepatică (aspartat aminotransferaza-AST, alanin aminotransferaza-ALT, lactat dehidrogenaza-LDH, bilirubina directă și totală), profilul lipidic (colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol și trigliceride), proteina C reactivă;
- *hematologici* – hemoleucogramă.

Cei doi compuși au fost administrați atât ca substanțe unitare, cât și sub formă de microparticule de chitosan – substanță activă, în doze echivalente cu 1/20 și 1/40 din DL_{50}.

10.4.2.2. Evaluarea parametrilor biochimici

Glicemia postprandială

Din rezultatele obținute (Fig. 10.22-10.23) s-a observat că valorile glicemiei înregistrate pentru loturile tratate cu microparticule (MCH-**6c**, MCH-**6e**) au fost inferioare celor înregistrate în cazul loturilor tratate cu substanțele respective în suspensie (**6c**, **6e**), evidențiindu-se astfel că încorporarea derivaților **6c** și **6e** în matricea polimerică este asociată cu o îmbunătățire a efectului hipoglicemiant.

Cel mai pronunțat efect hipoglicemiant s-a evidențiat în cazul microparticulelor de chitosan încărcate cu substanța **6c** (1/20 DL_{50}, lotul 5), pentru care s-a înregistrat o scădere de 46,33% la sfârșitul experimentului, comparabilă cu cea a pioglitazonei utilizată drept substanță de referință (56,00%).

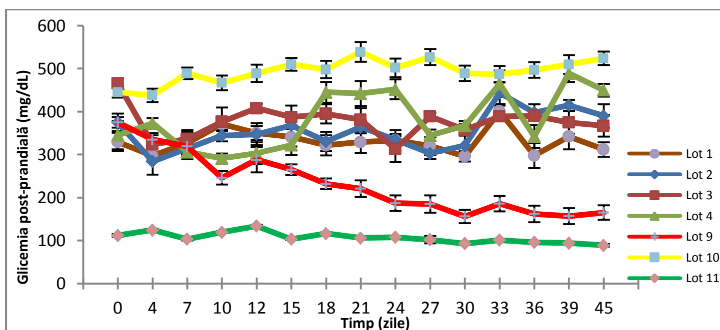


Fig. 10.22. Monitorizarea glicemiei postprandiale la şobolanii din loturile 1-4 şi 9-11. L1: MCH-**6e** (5 mg/mL)*, L2: **6e***, L3: MCH-**6e** (5 mg/mL)**, L4: **6e****, L9: pioglitazona, L10: martor diabet, L11: martor sănătos; * doză echivalentă 1/20 DL_{50}, **doză echivalentă 1/40 DL_{50}

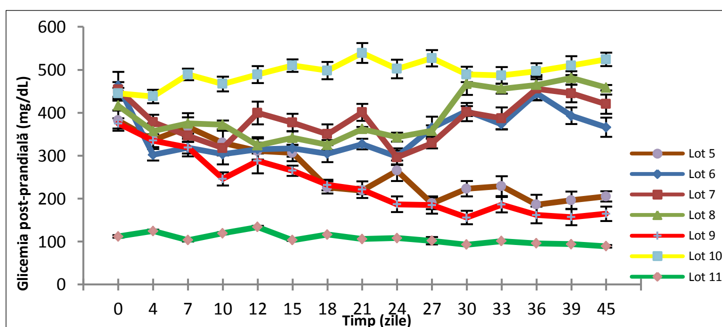


Fig. 10.23. Monitorizarea glicemiei postprandiale la şobolanii din loturile 5-8 şi 9-11. L5: MCH-**6c** (5 mg/mL)*, L6: **6c***, L7: MCH-**6c** (5 mg/mL)**, L8: **6c****, L9: pioglitazona, L10: martor diabet, L11: martor sănătos; * doză echivalentă 1/20 DL_{50}, **doză echivalentă 1/40 DL_{50}

Comparativ cu martorul diabet (lot 10), compușii testați, fie ca substanțe unitare, fie sub formă de microparticule, au redus valoarea glicemiei, intensitatea reducerii fiind dependentă de natura substanței, dar și de doza administrată. Astfel, pentru majoritatea loturilor s-a observat o corelare între nivelul de glucoză din sânge și doza utilizată, administrarea unei doze crescută producând un efect hipoglicemiant mai pronunțat. Se apreciază că efectul hipoglicemiant înregistrat în cazul loturilor 1-4 și 6-8 a fost mai slab decât al pioglitazonei (lot 9, 165 mg/dL), valorile glicemiei înregistrate la sfârșitul experimentului fiind superioare acesteia.

Hemoglobina glicată (HbA1c)

În Fig. 10.24 se prezintă valorile hemoglobinei glicate înregistrate pentru loturile studiate în zilele 21 și 45, conform protocolului de lucru.

Din datele obținute s-a observat că lotul martor diabet (lot 10) a prezentat cele mai mari valori ale hemoglobinei glicate: 10,20% în ziua 21 și 11,10% în ziua 45. În cazul compușilor studiați (lot 1-8), valorile HbA1c au fost mai mici comparativ cu cele înregistrate pentru lotul martor diabet, evidențiindu-se astfel potențialul hipoglicemiant al acestora. Compusul cel mai activ s-a dovedit a fi N-(4-*clor*fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-ona (**6c**), administrat sub formă de microparticule de chitosan în doză echivalentă cu 1/20 din DL_{50} (lot 5), evidențiind astfel faptul că înglobarea substanței în matricea biopolimerică a fost asociată cu o îmbunătățire a efectului terapeutic. Această formulare a dovedit cel mai bun control glicemic, înregistrând o valoare a hemoglobinei glicate în ziua 21 de 6,21% și în ziua 45 de 6,42%, valori ce corespund unei reduceri de 39,11% și respectiv 42,16% față de valoarea martorului diabet (lot 10). Valorile obținute în cazul acestui lot sunt comparabile cu cele înregistrate pentru substanța de referință – pioglitazona, care în ziua 21 a prezentat o valoare a HbA1c de 5,65%, iar în ziua 45 de 5,95%, ce corespund unei scăderi de 44,61% și respectiv 46,39% față de valorile martorului diabet.

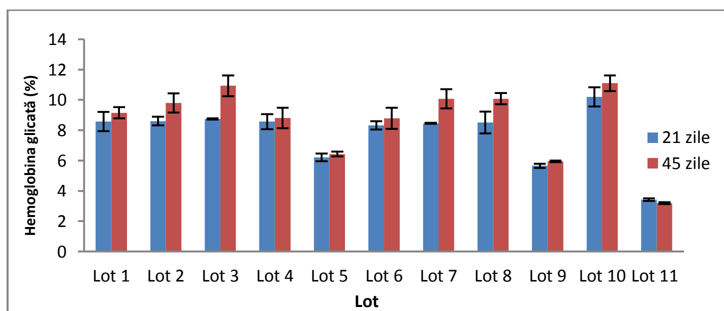


Fig. 10.24. Monitorizarea hemoglobinei glicate la șobolanii din loturile studiate.
L1: MCH-**6e** (5 mg/mL)*, L2: **6e***, L3: MCH-**6e** (5 mg/mL)**, L4: **6e****, L5: MCH-**6c** (5 mg/mL)*, L6: **6c***, L7: MCH-**6c** (5mg/mL)**, L8: **6c****, L9: pioglitazona, L10: martor diabet, L11: martor sănătos; * doză echivalentă 1/20 DL_{50}, **doză echivalentă 1/40 DL_{50}

Parametri biochimici de evaluare a funcției hepatice

Valorile parametrilor de afectare a funcției hepatice obținute pentru derivații de tiazolidin-4-onă selectati (**6c**, **6e**) (lot 1-8), comparativ cu valorile obținute pentru loturile tratate cu pioglitazonă (lot 9), martor diabet (lot 10) și martor sănătos (lot 11) sunt prezentate în Tabelele 10.18-10.20.

Tabel 10.18. Valorile parametrilor funcției hepatice pentru loturile 1-4

Parametru biochimic	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4
ALT (UI/L)	189,50±2,52	195,00±2,50	260,25±3,60	165,46±4,23
AST (UI/L)	1419,50±13,98	1076,50±18,96	2488,00±25,30	2068,92±26,75
LDH (UI/L)	7530,25±25,89	4654,50±38,18	10370,12±34,25	9436,35±25,71
Bilirubină totală (mg/dL)	0,33±0,09	0,50±0,03	0,47±0,15	0,69±0,04
Bilirubină directă (mg/dL)	0,04±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00

L1: MCH-**6e** (5 mg/mL)*, L2: **6e***, L3: MCH-**6e** (5 mg/mL)**, L4: **6e****; *doză echivalentă 1/20 DL_{50}, **doză echivalentă 1/40 DL_{50}

Tabel 10.19. Valorile parametrilor funcției hepatice pentru loturile 5-8

Parametru biochimic	Lot 5	Lot 6	Lot 7	Lot 8
ALT (UI/L)	112,33±2,05	137,68±1,42	135,37±1,63	244,25±1,95
AST (UI/L)	1292,68±13,45	723,56±15,87	2652,62±30,25	1911,33±24,68
LDH (UI/L)	5491,26±28,56	5573,00±30,50	6635,25±26,92	6657,36±34,25
Bilirubină totală (mg/dL)	0,68±0,04	0,81±0,01	0,71±0,04	0,85±0,09
Bilirubină directă (mg/dL)	0,04±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00

L5: MCH-**6c** (5 mg/mL)*, L6: **6c***, L7: MCH-**6c** (5 mg/mL)**, L8: **6c****; *doză echivalentă 1/20 DL_{50}, **doză echivalentă 1/40 DL_{50}

Tabel 10.20. Valorile parametrilor funcției hepatice pentru loturile 9-11

Parametru biochimic	Lot 9	Lot 10	Lot 11
ALT (UI/L)	162,50±1,25	314,52±4,26	101,10±0,55
AST (UI/L)	751,20±15,63	1688,24±12,34	239,93±1,85
LDH (UI/L)	4701,90±22,05	9075,35±20,76	1800,36±5,42
Bilirubină totală (mg/dL)	0,66±0,03	0,91±0,04	0,34±0,05
Bilirubină directă (mg/dL)	0,04±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00

L9: pioglitazona, L10: martor diabet, L11: martor sănătos

Valoarea indicatorului de citoliză (ALT) obținută în cazul șobolanilor diabetici (lot 10, 314,52 UI/L) a fost net superioară lotului martor sănătos (lot 11), dar și celorlalte loturi studiate, ceea ce evidențiază o afectare hepatică accentuată produsă de diabetul zaharat, dar ameliorată de substanțele active administrate. În cazul loturilor tratate cu derivatul **6c** unitar (lot 6, 137,68) și înglobat în microparticule de chitosan, în doză de 1/40 din DL_{50} (lot 7, 135,37 UI/L) s-a observat o atenuare mai pronunțată a afectării hepatice decât în urma administrării de pioglitazonă, substanța de referință (lot 9, 162,50 UI/L). Totodată, se apreciază faptul că administrarea

microparticulelor de chitosan – **6c**, în doză de 1/20 din DL_{50} (lot 5) a produs o ameliorare accentuată a afectării acestei enzime hepatice, valoarea ALT (112,33 UI/L) fiind comparabilă cu cea a martorului sănătos (101,10 UI/L). În cele mai multe cazuri, loturile tratate cu microparticule de chitosan – substanță activă au prezentat valori mai reduse ale activității enzimei ALT în comparație cu loturile cărora li s-a administrat substanța unitară.

Rezultatele obținute au evidențiat o reducere mai pronunțată a activității enzimei AST în urma tratamentului diabetului zaharat cu N-(4-*clor*fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-ona (**6c**) în doză echivalentă cu 1/20 din DL_{50} (lot 6, 723,56 UI/L) în comparație cu pioglitazona, utilizată ca și substanță de referință (751,20 UI/L).

Referitor la activitatea enzimei LDH, s-a observat că, în cele mai multe cazuri, loturile tratate atât cu substanțele unitare, cât și cu microsistemele de chitosan – substanță activă, au prezentat valori net inferioare lotului martor diabet (9075,35 UI/L), sugerând astfel efectul benefic al derivaților studiați în îmbunătățirea funcției hepatice alterate în condițiile diabetului zaharat. S-a evidențiat totodată importanța dozei administrate, creșterea dozei fiind asociată cu o reducere a valorii LDH. În cazul pioglitazonei s-a observat o reducere accentuată a activității acestei enzime, comparativ cu valoarea înregistrată în cazul lotului martor diabet (lot 10), valoarea înregistrată fiind de 4701,90 UI/L, comparativ cu valoarea de 9075,35 UI/L. Un efect similar a fost observat și în cazul derivatului N-(2-metoxifenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onă (**6e**) (lot 2), cu o valoare de 4654,50 UI/L, similară celei obținute cu substanța de referință.

Studiul realizat a evidențiat faptul că nivelurile bilirubinei serice totale au fost superioare limitei admise de literatura de specialitate, dar inferioare valorilor obținute în cazul șobolanilor diabetici (0,91 mg/dL), sugerând efectul favorabil al derivaților testați în reglarea mecanismelor de metabolizare și excreție a bilirubinei. Cea mai mică valoare a fost înregistrată în cazul lotului tratat cu MCH-**6e,** în doză 1/20 din DL_{50} (0,33 mg/dL), similară cu cea a șobolanilor nediabetici (0,34 mg/dL).

Capitolul 11

CONCLUZII GENERALE

Cercetările realizate în cadrul tezei de doctorat aduc contribuții importante la terapia diabetului zaharat de tip 2, afecțiune metabolică ce prezintă o prevalență în continuă creștere în ultimele decenii. Cercetările au vizat dezvoltarea de noi derivați de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică, precum și a unor noi sisteme de eliberare controlată polimer – substanță activă cu potențială utilizare în tratamentul diabetului zaharat tip 2.

1) Prin modularea structurală a teofilinei au fost sintetizați *27 compuși intermediari* (**2**, **3**, **4**, **5a-y**) și *11 compuși finali*, derivați de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică (**6a-k**), dintre care *32 compuși noi,* necitați în literatura de specialitate, după cum urmează:

- 1,3-dimetil-xantina - sare de sodiu (**2**);
- (1,3-dimetilxantin-7-il)acetat de etil (**3**);
- (1,3-dimetilxantin-7-il)acetil hidrazina (**4**);
- N-(R-benziliden)-2-(1,3-dimetilxantin-7-il) acethidrazină (**5a-y**);
- N-(R-fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onă (**6a-k**).

2) Toți compușii sintetizați, intermediari și finali, au fost caracterizați din punct de vedere fizico-chimic (formulă moleculară, masă molară, randament, temperatură de topire, factor de retenție, solubilitate în apă și în diferiți solvenți organici) și biofarmaceutic, *in silico*, prin estimarea coeficientului de partiție octanol/apă, coeficientului de distribuție octanol/apă, capacității de absorbție la nivel digestiv și a ariei topologice a suprafeței polare.

3) Structura compușilor intermediari și finali sintetizați a fost confirmată prin diferite metode spectrale: spectroscopie de absorbție în infraroșu, spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară (^{1}H-RMN, ^{13}C-RMN, ^{19}F-RMN, DEPT, 2D-COSY, HSQC, HMBC) și spectrometrie de masă de înaltă rezoluție (High Resolution Mass Spectrometry). Evidențierea protonilor s-a realizat prin intermediul ^{1}H-RMN, iar corelația dintre aceștia a fost validată de spectrele

bidimensionale 2D-COSY. Spectrele DEPT au întărit informațiile furnizate de spectrele ^{13}C-RMN, permițând diferențierea atomilor de carbon secundari de cei primari și terțiari. Corespondența dintre atomii de carbon și protonii de care se leagă sau care sunt la 2-4 legături chimice distanță a fost confirmate de spectrele HSQC, respectiv HMBC.

4) În urma procesului de reticulare ionică în prezența tripolifosfatului pentasodic, au fost dezvoltate *12 noi sisteme polimerice pe bază de chitosan* prin înglobarea, în diferite concentrații (3 mg/mL, 4 mg/mL și 5 mg/mL), a patru derivați de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică: N-(4-*clorfenil*)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onă (**6c**); N-(2-*metoxifenil*)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onă (**6e**); N-(4-*metoxifenil*)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onă (**6f**); N-(4-*metilfenil*)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onă (**6k**). Microparticulele de chitosan și respectiv chitosan – substanță activă, au fost caracterizate din punct de vedere morfologic (aspect, dimensiune) și fizico-chimic (randament de obținere, procent de încărcare, eficiența încapsulării, grad de umflare, capacitate de cedare a substanței active din matricea de chitosan). Prezența derivaților încorporați în matricea de chitosan a fost confirmată prin spectroscopie de absorbție în infraroșu.

5) Evaluarea potențialului antioxidant al derivaților de hidrazonă și tiazolidin-4-onă cu structură xantinică s-a realizat prin trei metode *in vitro*: efectul antiradicalic față de radicalii DPPH și ABTS și capacitatea totală antioxidantă.

Rezultatele obținute în cadrul studiului au evidențiat faptul că efectul antioxidant crește direct proporțional cu concentrația și este influențat de natura substituentului de pe nucleul aromatic. O serie de compuși au dovedit o acțiune antioxidantă mai intensă decât cea a teofilinei, compusul părinte, dar mai redusă decât a vitaminei C, utilizată drept control pozitiv. Pentru seria derivaților N-(R-benziliden)-2-(1,3-dimetilxantin-7-il)acethidrazină (**5a-y**), cei mai activi s-au dovedit a fi compușii ce prezintă următorii radicali inserați pe nucleul aromatic: 2-OH (**5p**), 3-OH (**5n**), 4-OH (**5o**), 4-CN (**5q**), 4-NO_2 (**5l**), 2,4,5-triOCH_3 (**5v**) și 3,4,5-triOCH_3 (**5x**). Majoritatea derivaților de N-(R-fenil)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onă (**6a-k**) au prezentat o activitate mai pronunțată decât cea a hidrazonelor corespunzătoare (**5a-k**),

evidențiindu-se astfel faptul că modularea structurală a nucleului xantinic prin introducerea heterociclului de tiazolidin-4-onă prezintă o influență favorabilă asupra activității antioxidante a compușilor sintetizați. Cei mai activi derivați din seria derivaților de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică au fost compușii care prezintă următorii substituenți grefați pe nucleul aromatic: 4-OCH_3 (**6f**), 2-OCH_3 (**6e**), 4-Cl (**6c**), 4-F (**6d**) și 4-CH_3 (**6k**).

6) Activitatea antimicrobiană a derivaților de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică **6a-k** a fost evaluată pe trei tulpini bacteriene (*Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Escherichia coli)* și 3 tulpini fungice (*Candida albicans, Candida glabrata, Candida parapsilosis*) utilizând două teste *in vitro*: metoda difuzimetrică pe mediu agarizat și metoda microdiluțiilor în bulion. Pentru unii derivați s-a observat intensificarea potențialului antimicrobian în comparație cu teofilina, modularea structurală realizată pe nucleul xantinic, prin introducerea heterociclului de tiazolidin-4-onă, fiind asociată cu o îmbunătățire a efectului antimicrobian. Cei mai activi compuși s-au dovedit a fi derivații **6d** (N-(4-*fluorofenil*)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onă) și **6k** (N-(4-*metilfenil*)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onă).

7) Evaluarea potențialului toxic a evidențiat o toxicitate redusă pentru derivaților de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică testați, pe baza valorilor DL_{50} putând fi încadrați în clasa substanțelor slab toxice. Modularea structurală a nucleului xantinic a fost asociată cu o scădere a gradului de toxicitate, compușii testați fiind mai puțini toxici decât teofilina, compusul părinte, dar și decât pioglitazona, medicament utilizat ca martor pozitiv în studiul realizat pe model de diabet indus cu streptozotocin.

8) Evaluarea potențialului antidiabetic al derivaților N-(4-*clorfenil*)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-ona (**6c**) și N-(2-*metoxifenil*)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid] tiazolidin-4-onă (**6e**) a fost realizată pe model de diabet zaharat indus cu streptozotocin la șobolan, prin determinarea parametrilor clinici, biochimici și hematologici specifici. Cei doi compuși au fost administrați atât ca substanțe unitare, cât și sub formă de microparticule de chitosan – substanță activă, în doze echivalente cu 1/20 și 1/40 din DL_{50}.

În urma analizei parametrilor clinici, s-a observat că administrarea cronică a derivaților **6c** și **6e** a fost asociată cu o ameliorare a simptomelor de polidipsie, polifagie și scădere în greutate caracteristice diabetului zaharat. Rezultatele studiului au evidențiat faptul că cel mai bun control glicemic a fost obținut în urma administrării de microparticule de chitosan – **6c** în doză echivalentă cu 1/20 din DL_{50}, apropiat de cel înregistrat pentru pioglitazona, utilizată drept substanță de referință. Evaluarea parametrilor funcției renale și hepatice a evidențiat o ameliorare a afectării renale și hepatice asociată cu diabetul zaharat în urma administrării derivaților de tiazolidin-4-onă testați. Analiza profilului lipidic a evidențiat, în cele mai multe cazuri, faptul că administrarea derivaților testați nu a avut efecte negative asupra parametrilor specifici, prezentând un risc scăzut de producere a afecțiunilor cardiovasculare și a hiperlipidemiilor. Valorile înregistrate pentru parametrii hematologici s-au încadrat în limite normale sau au prezentat mici variații, nesemnificative, față de acestea. Proteina C reactivă a prezentat valori ce se încadrează în limite normale, evidențiind un risc scăzut de dezvoltare a afecțiunilor cardiovasculare.

9) Dezvoltarea de noi compuși, originali, caracterizarea fizico-chimică, biofarmaceutică, spectrală și biologică a acestora, precum și încorporarea celor mai activi derivați în matrici polimerice pe bază de chitosan, au adus contribuții importante la dezvoltarea cunoașterii în domeniul afecțiunilor metabolice, cu precădere în diabetul zaharat tip 2.

Capitolul 12

ELEMENTE DE ORIGINALITATE ȘI PERSPECTIVE DE CERCETARE

Cercetările derulate în cadrul tezei de doctorat aduc contribuții importante în domeniul dezvoltării de noi compuși heterociclici cu potențială aplicație în tratamentul diabetului zaharat de tip 2. Originalitatea studiilor se bazează pe următoarele elemente:

- ✓ Compușii sintetizați se caracterizează printr-un design original, înglobând două structuri farmacofore cu activitate biologică dovedită: *nucleul xantinic* și heterociclul de *tiazolidin-4-onă.*

Structura *xantinică* este cunoscută în primul rând pentru efectul bronhodilatator și psihostimulent, dar studii recente atribuie acestui heterociclu și alte efecte biologice importante de tipul hipoglicemiant, antioxidant, antimicrobian, anticanceros, antiinflamator.

Pe de altă parte, heterociclul de *tiazolidin-4-onă*, cunoscut și sub denumirea de nucleu ”magic”, a suscitat în ultima perioadă interesul cercetătorilor motivat fiind de efectele biologice importante cu care a fost asociat: antidiabetic, antioxidant, antibacterian, antifungic, antiinflamator, antitumoral, antiviral, anticonvulsivant.

- ✓ Sinteza și caracterizarea fizico-chimică și spectrală (IR, ^{1}H-RMN, ^{13}C-RMN, ^{19}F-RMN, DEPT, 2D-COSY, HSQC, HMBC, HRMS) a *38 de compuși* (27 intermediari și 11 finali), dintre care *32 sunt compuși noi, necitați în literatura de specialitate,* derivați de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică.
- ✓ Identificarea a patru derivați de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică: N-(4-*clorfenil*)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onă (**6c**), N-(2-*metoxifenil*)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid]tiazolidin-4-onă (**6e**), N-(4-*metoxifenil*)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid] tiazolidin-4-onă (**6f**) și N-(4-*metilfenil*)-3-[(1,3-dimetilxantin-7-il)acetamid] tiazolidin-4-onă (**6k**), cu potențial antioxidant ce au dovedit un efect antiradicalic apreciabil.

- ✓ Dezvoltarea, caracterizarea morfologică, fizico-chimică, spectrală și farmacocinetică a 12 noi formulări pe bază de matrici polimerice de tip microparticule de chitosan – derivați de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică (MCH-**6c**, MCH-**6e**, MCH-**6f**, MCH-**6k**).
- ✓ Identificarea în urma studiilor *in vivo* pe model de diabet indus cu streptozotocin a formulării MCH-**6c** care, administrată în doză echivalentă cu 1/20 din DL_{50}, a dovedit un efect hipoglicemiant comparabil cu pioglitazona utilizată ca substanță de referință, dublat fiind de un profil de siguranță la nivel cardiovascular, hepatic și renal.

Rezultatele obținute în cadrul studiilor realizate sunt încurajatoare, îndreptățind astfel *continuarea* și *aprofundarea* cercetărilor prin:

- evaluarea potențialului antioxidant *in vivo*;
- optimizarea formulării de microparticule chitosan – substanță activă în vederea îmbunătățirii profilului farmacocinetic și farmacologic;
- dezvoltarea de noi sisteme polimerice de cedare controlată a substanței active (plasturi, filme buco-adezive);
- sinteza de noi derivați de tiazolidin-4-onă cu structură xantinică prin condensarea compușilor **6a-k** cu diferite aldehide aromatice și evaluarea compușilor obținuți din punct de vedere biologic.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Alam MS, Choi J-H, Lee D-U. Synthesis of novel Schiff base analogues of 4-amino-1,5-dimethyl-2-phenylpyrazol-3-one and their evaluation for antioxidant and anti-inflammatory activity. *Bioorgan Med Chem* 2012; 20(13): 4103–4108.

2. Apotrosoaei M, Vasincu IM, Dragan M et al. Design, synthesis and the biological evaluation of new 1,3-thiazolidine-4-ones based on the 4-amino-2,3-dimethyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-one scaffold. *Molecules* 2014; 19(9): 13824–13847.

3. Bai X, Niu Y, Zhu J et al. A new GLP-1 analogue with prolonged glucose-lowering activity in vivo via backbone-based modification at the N-terminus. *Bioorg Med Chem* 2016; 24: 1163–1170.

4. Beers MH, Porter RS, Muşat A et al. *Manualul Merck de diagnostic şi tratament*. 18thed. Bucuresti: All, 2009, 201-219.

5. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv Drug Deliver Rev* 2010; 62(1): 83–99.

6. Casqueiro J, Casqueiro J, Alves C. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. *Indian J Endocr Metab* 2012; 16 (Suppl 1): S27–S36.

7. Çıkla P, Özsavcı D, Bingöl-Özakpınar Ö et al. Synthesis, cytotoxicity, and pro-apoptosis activity of etodolac hydrazide derivatives as anticancer agents. *Arch Pharm* 2013; 346: 367–379.

8. Constantin S, Panzariu A, Vasincu I et al. Synthesis and evaluation of antioxidant activity of some hydrazones with xanthine structure. *Rev Med Chir Soc Med Nat* 2015; 119(3): 910–916.

9. Cooke FJ. Infections in people with diabetes. *Medicine* 2015; 43(1): 41–43.

10. Cryer PE. Hypoglycemia, functional brain failure, and brain death. *J Clin Invest* 2007; 117(4): 868–870.

11. Ertl P, Rohde B, Selzer P. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. *J Med Chem* 2000; 43(20): 3714–3717.

12. Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ et al. *Harisson-Principiile Medicinei Interne*, 14th ed. București: Teora, 2003, 2265-2295.

13. Gupta R, Walunj SS, Tokala RK et al. Emerging drug candidates of dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitor class for the treatment of Type 2 Diabetes. *Curr Drug Targets* 2009; 10(1): 71–87.
14. Herman JR, Dethloff LA, McGuire EJ et al. Rodent carcinogenicity with the thiazolidinedione antidiabetic agent troglitazone. *Toxicol Sci* 2002; 68(1): 226–236.
15. Hoare TR, Kohane DS. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* 2008; 49: 1993–2007.
16. Iovu M, Nicolescu TO. *Chimie Organică. Metode Experimentale*. București: Editura Universitară ”Carol Davila”, 2009.
17. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliver Rev* 2001; 46: 3–26.
18. Lupascu FG, Dash M, Samal SM et al. Development, optimization and biological evaluation of chitosan scaffold formulations of new xanthine derivatives for treatment of type-2 diabetes mellitus. *Eur J Pharm Sci* 2015; 77: 122–134.
19. Mitra A, Dey B. Chitosan microspheres in novel drug delivery systems. *Indian J Pharm Sci* 2011; 73(4): 355–66.
20. Oprea AM, Nistor MT, Popa MI et al. In vitro and in vivo theophylline release from cellulose/chondroitin sulfate hydrogels. *Carbohy Polym* 2012; 90(1): 127–133.
21. Restrepo BI, Camerlin AJ, Rahbar MH et al. Cross-sectional assessment reveals high diabetes prevalence among newly-diagnosed tuberculosis cases. *Bull World Health Organ* 2011; 89: 352–359.
22. Ruaño G, Bernene J, Windemuth A et al. Physiogenomic comparison of edema and BMI in patients receiving rosiglitazone or pioglitazone. *Clin Chim Acta* 2009; 400: 48–55.
23. Schäfer T, Klintschar M, Lichtinghagen R et al. Xanthochromia of the skull bone associated with HbA1c. *Forensic Sci Int* 2016; 260: 54–58.
24. Thomas JJ, Moring JC, Harvey T et al. Risk of type 2 diabetes: health care provider perceptions of prevention adherence. *Appl Nurs Res* 2016; 32: 1–6.
25. Tiwari BK, Pandey KB, Abidi AB, Rizvi SI et al. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. *J Biomark* 2013; 2013: 1–8.

26. Valensi P, Picard S. Lipids, lipid-lowering therapy and diabetes complications. *Diabetes Metab* 2011; 37(1): 15–24.
27. Vanucci-Bacqué C, Carayon C, Bernis C et al. Synthesis, antioxidant and cytoprotective evaluation of potential antiatherogenic phenolic hydrazones. A structure-activity relationship insight. *Bioorg Med Chem* 2014; 22: 4269–4276.
28. Vasincu IM, Apotrosoaei M, Panzariu A-T et al. Synthesis and biological evaluation of new 1,3-Thiazolidine-4-one Derivatives of 2-(4-Isobutylphenyl)propionic Acid. *Molecules* 2014; 19(9): 15005–15025.
29. Yadav R, Bansal R, Rohilla S et al. Synthesis and pharmacological characterization of novel xanthine carboxylate amides as A 2A adenosine receptor ligands exhibiting bronchospasmolytic activity. *Bioorg Chem* 2016; 65: 26–37.
30. Zuo A, Yu Y, Li J et al. Study on the relation of structure and antioxidant activity of isorhamnetin, quercetin, phloretin, silybin and phloretin isonicotinyl hydrazone. *Free Radicals and Antioxidants* 2011; 1(4): 39–47.

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE

Articole *in extenso* ca și prim autor din tema tezei de doctorat

- ***Lucrări ISI***

1. Sandra Constantin, Frederic Buron, Sylvain Routier, Luminița Confederat, Andreea Teodora Iacob, Anca Miron, Lenuța Profire – Studies on xanthine derivatives (ii). Synthesis and Antioxidant effects of some hydrazones with Xanthine structure. *Farmacia* 2016, 64(4): 565-571 (ISI, FI=1,162);
2. Sandra Constantin, Florentina Geanina Lupascu, Maria Apotrosoaei, Ioana Mirela Vasincu, Dan Lupascu, Frederic Buron, Sylvain Routier, Lenuta Profire – Synthesis and Biological Evaluation of New 1,3-Dimethylxanthine Derivatives with Thiazolidine-4-one Scaffold. *Chemistry Central Journal* 2016, *under review* (ISI, FI=2,55);

- ***Lucrări BDI***

3. Sandra Constantin, Andreea Pânzariu, Ioana Vasincu, Maria Apotrosoaei, Luminiţa Confederat, F. Buron, S. Routier, Lenuţa Profire – Synthesis and evaluation of antioxidant activity of some hydrazones with xanthine structure. *Revista Medico-Chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști* 2015, 119(3): 910-916 (BDI, B+).

Alte articole *in extenso* ca și coautor

- ***Lucrări ISI***

1. Andreea‑Teodora Pânzariu, Maria Apotrosoaei, Ioana Mirela Vasincu, Maria Drăgan, Sandra Constantin, Frédéric Buron, Sylvain Routier, Lenuta Profire, Cristina Tuchilus - Synthesis and biological evaluation of new 1,3‑thiazolidine‑4‑one derivatives of nitro‑l‑arginine methyl ester. *Chemistry Central Journal* 2016, 10: 6-20 (ISI, FI=2,55);
2. Luminița Confederat, Roxana Ștefan, Florentina Lupaşcu, Sandra Constantin, Iustina Avram, Lenuța Profire – Side effects induced by hypoglycemic sulfonylureas to diabetic patients- a retrospective study. *Farmacia* 2016, *under review* (ISI, FI=1,162);

- ***Lucrări BDI***

3. Andreea-Teodora Iacob, Maria Drăgan, Sandra Constantin, Florentina Lupașcu, Luminița Confederat, F. Buron, S. Routier,

Lenuța Profire – Evaluation of antioxidant activity of some imines derivatives of L-arginine. Revista Medico-Chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști 2016, 120(2): 439-444 (BDI, B+);

4. Andreea-Teodora Pânzariu, Maria Drăgan, Ioana Vasincu, Oana Dragostin, Florentina Lupașcu, Sandra Constantin, F. Buron, S. Routier, Lenuța Profire – Schiff Bases of L-lysine: Microwave induced synthesis, characterization and biological activity. *Revista Medico-Chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști* 2015, 119(3): 931-937 (BDI, B+);
5. Luminita Confederat, Roxana Stefan, Sandra Constantin, Monica Hăncianu, Lenuta Profire - Prevalence of Physiological, Pathological and Behavioral Risk Factors in Patients Treated with Antidiabetic Sulfonylureas. *Acta Medica Marisiensis* 2015, 61(4): 342-344 (BDI, B+);
6. Luminița Confederat, Sandra Constantin, Florentina Lupașcu, Andreea Pânzariu, Monica Hăncianu, Lenuța Profire – Hypoglycemia induced by antidiabetic sulfonylureas. *Revista Medico-Chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști* 2015, 119(2): 579-584 (BDI, B+);
7. Maria Apotrosoaei, Ioana Vasincu (Geangalau), Sandra Constantin, F. Buron, S. Routier, Lenuta Profire – Synthesis, characterization and antioxidant activity of some new thiazolidin-4-one derivatives. *Revista Medico-Chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști* 2014, 118(1): 213-218 (BDI, B+);
8. Maria Apotrosoaei, Ioana Vasincu, Cristina Tuchilus, Florentina Lupașcu, Sandra Constantin, D. Lupașcu, Lenuța Profire – New hydrazones with pyrazolone structure : synthesis, characterization and biological evaluation. *Revista Medico-Chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști* 2013, 117(2): 538-544 (BDI, B+).

Participări la conferințe naționale și internaționale

1. Sandra Constantin, F. Buron, S. Routier, Luminiţa Confederat, Maria Drăgan, Florentina Lupaşcu, Dan Lupaşcu, Lenuța Profire – Sinteza și evaluarea acțiunii antioxidante a unor noi tiazolidin-4-one cu structură xantinică. *Congresul Național de Farmacie din România, ediția a XVI-a*, București, 28 septembrie-01 octombrie 2016 (rezumat și comunicare orală);

2. Maria Drăgan, Cătălina Daniela Stan, Andreea Teodora Iacob, Ioana-Mirela Vasincu, Maria Apotrosoaei, Florentina Lupascu, Sandra Constantin, Mihaela Boanca, Cătălina Elena Lupusoru, Lenuta Profire – Evaluarea potențialului antiinflamator al unor noi derivati de tiazolidin-4-ona ai acidului ferulic. *Congresul Național de Farmacie din România, ediția a XVI-a,* București, 28 septembrie-01 octombrie 2016 (rezumat și comunicare orală);
3. Luminița Confederat, Florentina Lupașcu, Sandra Constantin, Andreea-Teodora Iacob, Lenuța Profire – Formularea și caracterizarea *in vitro* a unor sisteme de cedare controlată chitosan – glimepirid. *Congresul Național de Farmacie din România, ediția a XVI-a,* București, 28 septembrie-01 octombrie 2016 (rezumat și poster);
4. Florentina Lupașcu, Iustina Avram, Luminița Confederat, Andreea Teodora Iacob, Maria Drăgan, Sandra Constantin, Cristinel Stan – Dezvoltarea unor noi sisteme polimer medicament eficiente în terapia diabetului zaharat. *Congresul Național de Farmacie din România, ediția a XVI-a,* București, 28 septembrie-01 octombrie 2016 (rezumat și poster);
5. Sandra Constantin, Frederic Buron, Sylvain Routier, Lenuța Profire – Synthèses et évaluations biologiques d'hydrazones-xanthine. *Actes de neuvième Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée Cofrroca*, Clermont Ferrand (Franța), 29 iunie-01 iulie 2016, pag. 26 (rezumat și comunicare orală);
6. Sandra Constantin, Ioana-Mirela Vasincu, Maria Drăgan, Florentina Lupașcu, Maria Apotrosoaei, Roxana-Georgiana Taușer, Dan Lupașcu, Lenuța Profire – Derivații xantinici naturali de-a lungul timpului. *A XXV-a Reuniune Națională Aniversară de Istoria Farmaciei*, Cluj Napoca, 30 iunie-2 iulie 2016, pg 132-136 (lucrare *in extenso* și poster);
7. Maria Drăgan, Andreea Teodora Iacob, Oana Dragostin, Cristina Iancu, Florentina Lupașcu, Sandra Constantin, Ioana Vasincu, Luminița Confederat, Lenuța Profire, Cătălina Daniela Stan – Marele chimist Nenițescu, *A XXV-a Reuniune Națională Aniversară de Istoria Farmaciei*. Cluj Napoca, 30 iunie-2 iulie 2016, pg 158-162 (lucrare *in extenso* și poster);
8. Dan Lupașcu, Roxana-Georgiana Taușer, Sandra Constantin, Ioana Vasincu, Lenuța Profire – De la Salvarsan la Sofosbuvir-Drumul sinuos al progresului chimioterapiei antimicrobiene. *A XXV-a Reuniune Națională Aniversară de Istoria Farmaciei*, Cluj

Napoca, 30 iunie-2 iulie 2016, pg 200-205 (lucrare *in extenso* și poster);

9. Roxana-Georgiana Tauşer, Dan Lupașcu, Sandra Constantin, Ioana-Mirela Vasincu, Lenuța Profire – Istoria farmacogeneticii. *A XXV-a Reuniune Națională Aniversară de Istoria Farmaciei*, Cluj Napoca, 30 iunie-2 iulie 2016, pg 330-335 (lucrare *in extenso* și poster);
10. Ioana-Mirela Vasincu, Alexandru Vasincu, Sandra Constantin, Maria Drăgan, Dan Lupașcu, Roxana-Georgiana Taușer, Lenuța Profire – Impactul descoperirilor lui Louis Pasteur asupra civilizației moderne. *A XXV-a Reuniune Națională Aniversară de Istoria Farmaciei*, Cluj Napoca, 30 iunie-2 iulie 2016, pg 363-367 (lucrare *in extenso* și poster);
11. Sandra Constantin, Frédéric Buron, Sylvain Routier, Lenuţa Profire – Noi derivaţi de tiazolidin-4-onă cu potenţială acţiune biologică. *Sesiunea Science Fair* din cadrul proiectului ”Parteneriat strategic pentru creşterea calităţii cercetării ştiinţifice din universităţile medicale prin acordarea de burse doctorale şi postdoctorale – DocMed.Net_2.0”, POSDRU/159/1.5/S/136893, Sibiu, 19-20 iunie 2015 (poster);
12. Sandra Constantin, Luminița Confederat, Andreea Pânzariu, Frederic Buron, Sylvain Routier, Lenuța Profire – Istoria tiazolidindionelor cu acțiune antidiabetică. *A XXIV-a Reuniune Națională Aniversară de Istoria Farmaciei,* Sibiu, 11-13 iunie 2015, pg 112-117 (lucrare *in extenso* și poster);
13. Andreea-Teodora Pânzariu, Maria Apotrosoaei, Sandra Constantin, Maria Drăgan, Oana-Maria Dragostin, Florentina Lupaşcu, Ioana Vasincu, Lenuţa Profire – Aminoacizii – o neprețuită sursă de viață. *A XXIV-a Reuniune Națională Aniversară de Istoria Farmaciei,* Sibiu, 11-13 iunie 2015, pg 287-292 (lucrare *in extenso* și poster);
14. Sandra Constantin, Andreea Panzariu, Frédéric Buron, Sylvain Routier, Lenuța Profire – The synthesis and antioxidant activity evaluation of benzylidene-hydrazino-acetyl-theophylline derivatives. *Journée Jeunes Chercheurs de la Section Régionale Centre-Ouest, Société Chimique de France*, Orleans (Franța), 18-20 februarie 2015 (rezumat și poster);
15. Andreea-Teodora Panzariu, Sandra Constantin, Frédéric Buron, Sylvain Routier, Lenuta Profire – Synthesis and biological evaluation of schiff base derivatives of arginine. *Journée Jeunes Chercheurs de la Section Régionale Centre-Ouest, Société*

Chimique de France, Orleans (Franța), 18-20 februarie 2015 (rezumat și poster);

16. Sandra Constantin – Noi derivați de tiazolidin-4-onă cu potențială acțiune antidiabetică. *Sesiunea Journal Club* din cadrul proiectului ”Parteneriat strategic pentru creşterea calităţii cercetării ştiinţifice din universităţile medicale prin acordarea de burse doctorale şi postdoctorale – DocMed.Net_2.0”, POSDRU/159/1.5/S/136893, Iași, noiembrie 2014 (comunicare orală);
17. Sandra Constantin, Florentina Lupașcu, Andreea Pânzariu, Luminița Confederat, Lenuța Profire – Sinteza, caracterizarea și evaluarea biologică a unor noi hidrazone cu structură xantinică. *Congresul Naţional de Farmacie din România, ediţia a XV-a,* Iași, 24-27 septembrie 2014, pg 61 (rezumat și poster);
18. Florentina Geanina Lupaşcu, Cătălina Elena Lupuşoru , Oana Maria Dragostin, Sandra Constantin, Lenuţa Profire – Evaluarea potențialului hipoglicemiant și toxic al unor derivați de tiazolidin-4-onă. *Congresul Naţional de Farmacie din România, ediţia a XV-a*, Iași, 24-27 septembrie 2014, pg 19 (rezumat și comunicare orală);
19. Luminiţa Confederat, Florentina Geanina Lupaşcu, Sandra Constantin, Lenuţa Profire – Incretinele - ţintă terapeutică în tratamentul diabetului zaharat. *Congresul Naţional de Farmacie din România, ediţia a XV-a*, Iași, 24-27 septembrie 2014, pg 42 (rezumat și poster);
20. Maria Apotrosoaei, Cristina Tuchilus, Ioana Vasincu, Sandra Constantin, Frederic Buron, Sylvain Routier, Lenuta Profire – New thiazolidin-4-one derivatives of antypirine – synthesis, characterization and biological evaluation. *11th International Congress of Young Chemists ”YoungChem2013”*, Poznan (Polonia), 9-13 octombrie 2013, pg 134 (rezumat și poster);
21. Andreea Pânzariu, Oana Maria Dragostin, Florentina Lupaşcu, Sandra Constantin, Lenuţa Profire – Istoria sulfonamidelor ca agenți terapeutici. *A XXII-a Reuniune Națională de Istoria Farmaciei*, Iași, 4-6 aprilie 2013 (poster).